



**RENATA SOFIA
BARROS SANTOS**

**ESTUDO DOS FATORES QUE INFLUENCIAM OS
ATRIBUTOS DE ESFERAS DE ALGINATO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor José António Teixeira Lopes da Silva, professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e Doutor Domingos Paulo Ferreira de Almeida, Diretor de Inovação do Grupo Frulact.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão pelo apoio e paciência prestados na realização da dissertação de mestrado como também pelo profundo apoio e confiança dedicados ao longo do meu percurso pessoal e profissional.

o júri

presidente

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Domingos Paulo Ferreira de Almeida
professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e Diretor de Inovação do Grupo Frulact.

Prof. Doutor José António Teixeira Lopes da Silva
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço à Frulact, S.A. por ter aceite colaborar com a Universidade de Aveiro e pelo acolhimento na realização do estágio curricular no âmbito do Mestrado em Biotecnologia.

Ao Dr. Domingos Almeida pela orientação atenta de todo o projeto.

À Universidade de Aveiro e em particular ao Dr. José Lopes da Silva pela oportunidade da realização deste trabalho e pela orientação científica disponibilizada.

A todos os colaboradores e colegas da Frulact, S.A. que acompanharam e apoiaram de perto todos os momentos da realização do estágio e com quem tive o agradável prazer de conviver e trabalhar.

À Mafalda Andrade pela ajuda na realização prática de algumas tarefas deste trabalho.

Aos meus pais, irmão, familiares e amigos por todo o apoio e força que me transmitiram e pela paciência que tiveram nos momentos mais ocupados.

palavras-chave

Inovação, desenvolvimento de novos produtos, alginato de sódio, cloreto de cálcio, gelificação por difusão, esferas de alginato.

resumo

É apostando na inovação, investigação e desenvolvimento que as empresas atualmente podem criar valor e diferenciar da concorrência os seus produtos. Neste trabalho, desenvolvido na empresa Frulact, S.A., pretendeu-se estudar e sistematizar o efeito dos fatores que influenciam a produção de esferas de alginato, uma vez que estas são cada vez mais do interesse da empresa porque funcionam como matriz transportadora de moléculas de importância biológica, nomeadamente ingredientes alimentares. Posteriormente e tendo em consideração os conhecimentos adquiridos, pretendeu-se aplicá-los no desenvolvimento de um novo conceito deste tipo de produto, nomeadamente esferas de queijo para aplicação em produtos cárneos.

Na primeira fase avaliou-se o efeito da concentração de alginato, concentração de cloreto de cálcio, temperatura da solução de alginato (preparado), tipo de alginato e condições de tratamento térmico (temperatura e tempo de pasteurização) nas características das esferas de alginato, produzidas pelo método de gelificação por difusão, nomeadamente na massa, firmeza, adesividade, perfil de textura e esfericidade. Demonstrou-se que a concentração de alginato e a concentração de cloreto de cálcio têm efeito significativo nas características das esferas, que a temperatura do preparado tem principalmente efeito na duração da operação de gelificação, que cada tipo de alginato implicará em utilizações futuras um processo de otimização individual das condições de atuação e que, apesar das condições de pasteurização terem efeito nas características das esferas, não se conseguiu estabelecer um modelo que as relacione.

Na segunda fase testaram-se diversas formulações diferenciadas pela concentração de queijo creme tipo flamengo “Continente” (0 a 90 %), concentração de alginato (0,5 a 1 %) e concentração de amido (0 a 4 %) incorporadas e além disso analisaram-se diversas condições para aumentar o tempo de vida das esferas de queijo, nomeadamente o uso de conservantes, o armazenamento em diferentes condições de temperatura e também a incorporação das esferas numa calda acidificada com ácido láctico. Demonstrou-se que se podem produzir esferas viáveis até uma incorporação de 50 % de queijo, mas o produto final desenvolvido apresenta na sua constituição 15 % queijo, 1 % alginato, 1,5 % amido modificado de milho e 0,1 % sorbato de potássio, e para garantir a sua segurança a nível microbiológico, este tem que ser incorporado numa calda ácida, posteriormente armazenada em condições de refrigeração, pelo período de tempo que anteceda a aplicação das esferas no produto final.

keywords

Innovation, development of new products, sodium alginate, calcium chloride, gelation by diffusion, alginate beads.

abstract

Innovation, research and development can create value and differentiate products from competitors. In this work, developed at the company Frulact, S.A., we have studied and systematized the effect of the factors that influence the production of alginate beads, as these are of great interest because they function as carriers matrix molecules of biological importance, mainly in food ingredients. Taking into account the knowledge acquired, we planned to apply them in developing a new concept of this type of product, such as cheese beads for use in meat products.

It was evaluated the effect of the alginate concentration, the calcium chloride concentration, the temperature of the alginate solution, the type of alginate and heat treatment conditions (temperature and pasteurization time); it was also evaluated the alginate beads properties, produced by gelation by diffusion method namely mass, firmness, stickiness, the texture profile and sphericity. It was demonstrated that the alginate concentration and the calcium chloride concentration have a significant effect on the beads characteristics and the preparation temperature has mainly an effect on the gelation operation time. Despite the pasteurization conditions have an effect on the beads characteristics it was not possible to establish a model that relates both factors. Each alginate type will need a specific optimization process.

After this study several formulations were tested using different cream cheese "flamengo" brand concentrations (0 – 90 %), alginate concentrations (0,5 – 1 %) and starch concentrations (0 – 4 %); it was also studied conditions to increase cheese beads lifetime such as preservatives, storage temperatures and also the use of beads acidified in a lactic acid medium. It was demonstrated that it was possible to incorporate as far as 50 % of cheese to beads. It was developed a final product with 15 % cheese, 1,5 % modified corn starch, 1 % alginate and 0,1 % potassium sorbate and to ensure the microbiological safety the product has to be preserved in acid medium and then stored under refrigerated conditions for a period of time before the application of the beads in the final meat product.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABELAS	VII
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	- 1 -
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	- 3 -
2.1. POLISSACARÍDEOS	- 3 -
2.1.1. Classificação e estrutura	- 3 -
2.1.2. Polissacarídeos e o processo de formação de géis	- 4 -
2.1.3. Polissacarídeos na formulação dos alimentos	- 6 -
2.2. ALGINATOS	- 9 -
2.2.1. Introdução	- 9 -
2.2.2. Fontes	- 9 -
2.2.3. Produção de alginatos comerciais	- 10 -
2.2.4. Propriedades dos alginatos	- 12 -
2.2.4.1. Composição e estrutura	- 12 -
2.2.4.2. Massa molecular	- 13 -
2.2.4.3. Viscosidade de soluções aquosas de alginatos	- 14 -
2.2.4.4. Ligação/Permuta Iônica	- 18 -
2.2.4.5. Solubilidade	- 19 -
2.2.4.6. Estabilidade	- 20 -
2.3. PROCESSO DE GELIFICAÇÃO DOS ALGINATOS	- 20 -
2.3.1. Mecanismos de gelificação	- 21 -
2.3.1.1. Géis alginato-cálcio	- 21 -
2.3.1.2. Géis ácido algínico	- 23 -
2.3.1.3. Géis propileno glicol alginato	- 23 -
2.3.2. Preparação de géis alginato-cálcio	- 24 -
2.3.2.1. Homogeneidade dos géis	- 27 -
2.3.2.2. Cinética da gelificação	- 28 -
2.3.2.3. Força do gel	- 28 -
2.3.3. Aplicações dos géis de alginato na área alimentar	- 29 -
2.3.3.1. Encapsulamento de moléculas de importância biológica	- 31 -

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	- 32 -
3.1. Estratégia de desenvolvimento experimental	- 32 -
3.1.1. Gelificação por difusão – Estudo do efeito das variáveis do processo	- 33 -
3.1.1.1. Formulação base	- 33 -
3.1.1.2. Preparação das esferas de alginato	- 33 -
3.1.1.3. Descrição das diferentes etapas	- 34 -
3.1.2. Desenvolvimento de novos produtos	- 37 -
3.2. Análises físico-químicas	- 39 -
3.2.1. Viscosidade	- 39 -
3.2.2. Teor em sólidos solúveis	- 39 -
3.2.3. pH	- 40 -
3.2.4. Condutividade	- 40 -
3.2.5. Massa	- 41 -
3.2.6. Textura	- 41 -
3.2.6.1. Método 1 – Compressão	- 43 -
3.2.6.2. Método 2 – <i>Texture Profile Analysis</i> (TPA)	- 43 -
3.2.7. Esfericidade	- 44 -
3.2.8. Análises microbiológicas	- 44 -
3.2.8.1. Microrganismos a 30 °C	- 45 -
3.2.8.2. Bolores e Leveduras	- 47 -
3.3. Análise estatística	- 48 -
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	- 49 -
4.1. Gelificação por difusão – Estudo do efeito das variáveis do processo	- 49 -
4.1.1. Concentração de alginato versus concentração de cloreto de cálcio	- 49 -
4.1.1.1. Caracterização da solução de alginato original	- 49 -
4.1.1.2. Caracterização das esferas de alginato	- 50 -
4.1.2. Concentração de alginato versus temperatura do preparado	- 56 -
4.1.2.1. Caracterização da solução de alginato original	- 56 -
4.1.2.2. Caracterização da solução de cloreto de cálcio	- 57 -
4.1.2.3. Caracterização das esferas de alginato	- 59 -
4.1.3. Tipo de alginato	- 65 -
4.1.3.1. Caracterização da solução de alginato original	- 65 -
4.1.3.2. Caracterização das esferas de alginato	- 66 -

4.1.4. Tratamento térmico	- 68 -
4.1.4.1. Fase A	- 68 -
4.1.4.1.1. Caracterização da solução de alginato original	- 68 -
4.1.4.1.2. Caracterização da solução de cloreto de cálcio	- 69 -
4.1.4.1.3. Caracterização das esferas de alginato	- 71 -
4.1.4.2. Fase B	- 77 -
4.1.4.2.1. Caracterização da solução de alginato original	- 77 -
4.1.4.2.2. Caracterização das esferas de alginato	- 78 -
4.1.5. Produção industrial	- 81 -
4.1.5.1. Caracterização da solução de alginato original	- 81 -
4.1.5.2. Caracterização da solução de cloreto de cálcio	- 82 -
4.1.5.3. Caracterização das esferas de alginato	- 84 -
4.2. Desenvolvimento de novos produtos	- 85 -
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	- 99 -
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 101 -
7. ANEXOS	- 104 -
7.1. Exemplos de tipos de sequências de unidades monoméricas nalguns hidratos de carbono.	- 104 -
7.2. Exemplos de aplicações de polissacarídeos em alimentos (adaptada de Belitz, 2009).	- 105 -
7.3. Hidrocolóides: Funções e aplicações alimentares (adaptada de Stephen, 2006).	- 106 -
7.4. Parâmetros de composição e sequência de alginatos derivados de algas.	- 107 -
7.5. Características genéricas dos alginatos testados na terceira etapa do trabalho.	- 108 -
7.6. Fotografias da análise da textura das esferas de alginato utilizando como sonda a placa de compressão (a) e a sonda <i>Back Extrusion</i> (b).	- 108 -
7.7. Tratamento de imagem e determinação da relação entre pixéis e milímetros para a determinação da dimensão das esferas.	- 109 -
7.8. Fotografias dos testes preliminares de incorporação de esferas sem queijo (i), esferas com 30% queijo (ii) e esferas com 50% queijo (iii) em peças de fiambre perna extra.	- 110 -
7.9. Fotografias dos testes preliminares de incorporação de esferas sem queijo (i), esferas com 30% queijo (ii) e esferas com 50% queijo (iii) em peças de fiambre de peru.	- 111 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de um processo de produção.	- 5 -
Figura 2. Agregação intercadeias entre conformações regulares.	- 6 -
Figura 3. Produção de ácido algínico, de sais e éster comerciais fornecidos pela FMC.	- 11 -
Figura 4. Estrutura dos blocos constituintes do alginato.	- 13 -
Figura 5. Representação esquemática de uma cadeia de alginato constituída por diferentes arranjos das unidades M e G.	- 13 -
Figura 6. Viscosidade em soluções de alginato 1% a diferentes temperaturas.	- 16 -
Figura 7. Interação específica do cálcio com caixas de blocos de ácido gulurónico.	- 21 -
Figura 8. Mecanismos de interação cooperativa entre o cálcio e o alginato.	- 22 -
Figura 9. Configurações para o método gelificação por difusão.	- 25 -
Figura 10. Esquema das variáveis de processo envolvidas na formação de esferas de alginato de cálcio.	- 32 -
Figura 11. Esquematização geral do procedimento experimental.	- 34 -
Figura 12. Perfil típico de textura de um gel.	- 43 -
Figura 13. Variação da massa das esferas com a concentração de alginato e com a concentração de cloreto de cálcio e análise estatística associada.	- 52 -
Figura 14. Variação da firmeza das esferas com a concentração de alginato e com a concentração de cloreto de cálcio em (i) esferas não aplicadas em solução ácida e (ii) esferas aplicadas em solução ácida e análise estatística associada.	- 53 -
Figura 15. Variação da adesividade das esferas com a concentração de alginato e com a concentração de cloreto de cálcio em (i) esferas não aplicadas em solução ácida e (ii) esferas aplicadas em solução ácida e análise estatística associada.	- 54 -
Figura 16. Variação da esfericidade das esferas com a concentração de alginato e com a concentração de cloreto de cálcio e análise estatística associada.	- 55 -
Figura 17. Variação da viscosidade da solução de alginato original (preparado) com a concentração de alginato e com a concentração de cloreto de cálcio.	- 57 -
Figura 18. Variação da condutividade da solução de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de esferas de alginato, a partir de 1 L de preparado.	- 57 -
Figura 19. Reta de calibração – Relação entre a condutividade elétrica e a concentração de cloreto de cálcio.	- 58 -
Figura 20. Variação da concentração da solução de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de esferas de alginato, a partir de 1 L de preparado.	- 58 -
Figura 21. Percentagem média de redução da concentração de cloreto de cálcio ao longo	- 59 -

da operação de gelificação por difusão com a concentração de alginato usada na formulação do preparado.

Figura 22. Variação da massa das esferas com a concentração de alginato e com a temperatura do preparado e análise estatística associada. - 61 -

Figura 23. Variação da firmeza das esferas com a concentração de alginato e com a temperatura do preparado e análise estatística associada. - 62 -

Figura 24. Variação da adesividade das esferas com a concentração de alginato e com a temperatura do preparado e análise estatística associada. - 62 -

Figura 25. Variação da fraturabilidade (i), coesividade (ii), gomosidade (iii), mastigabilidade (iv) e resiliência (v) das esferas de alginato com a concentração de alginato e com a temperatura do preparado e análise estatística associada. - 64 -

Figura 26. Variação da condutividade da solução de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de esferas de alginato, a partir de 1 L de preparado. - 70 -

Figura 27. Variação da concentração da solução de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de esferas de alginato, a partir de 1 L de preparado. - 70 -

Figura 28. Percentagem média de redução da concentração de cloreto de cálcio ao longo da operação de gelificação por difusão com a temperatura de pasteurização do preparado. - 71 -

Figura 29. Variação da massa das esferas com a temperatura e tempo de pasteurização e análise estatística associada. - 73 -

Figura 30. Variação da firmeza das esferas com a temperatura e tempo de pasteurização e análise estatística associada. - 74 -

Figura 31. Variação da adesividade das esferas com a temperatura e tempo de pasteurização e análise estatística associada. - 74 -

Figura 32. Variação da esfericidade das esferas com a temperatura e tempo de pasteurização e análise estatística associada. - 75 -

Figura 33. Variação da fraturabilidade (i), gomosidade (ii), mastigabilidade (iii) e resiliência (iv) das esferas de alginato com a temperatura e tempo de pasteurização e análise estatística associada. - 76 -

Figura 34. Variação da viscosidade da solução de alginato original (preparado) formulada com dois amidos distintos com a temperatura de pasteurização. - 78 -

Figura 35. Variação da massa das esferas com o tipo de amido utilizado na formulação e com a temperatura de pasteurização e análise estatística associada. - 80 -

Figura 36. Variação da firmeza (i) e adesividade (ii) das esferas com o tipo de amido utilizado na formulação e com a temperatura de pasteurização e análise estatística - 81 -

associada.

Figura 37. Variação da condutividade da solução de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de 160 kg, em média, de esferas de alginato para cada uma das versões produzidas industrialmente. - 82 -

Figura 38. Variação da concentração da solução de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de 160 kg, em média, de esferas de alginato para cada uma das versões produzidas industrialmente. - 83 -

Figura 39. Percentagem média de redução da concentração de cloreto de cálcio ao longo da operação de gelificação por difusão de versões distintas de preparados. - 83 -

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de alguns polissacarídeos segundo propriedades funcionais.	- 7 -
Tabela 2. Áreas e aplicações dos alginatos na indústria alimentar (adaptada de Imeson, 1997).	- 30 -
Tabela 3. Formulação base utilizada na realização dos ensaios.	- 33 -
Tabela 4. Formulação de produto acabado.	- 37 -
Tabela 5. Formulações iniciais estabelecidas para a produção de esferas de alginato pelo método de gelificação por difusão.	- 38 -
Tabela 6. Definições e métodos para avaliar os atributos de textura (adaptada de ISO11036).	- 42 -
Tabela 7. Parâmetros avaliados durante a preparação das diferentes versões de preparado.	- 49 -
Tabela 8. Caracterização das esferas produzidas e análise estatística dos parâmetros avaliados.	- 51 -
Tabela 9. Parâmetros avaliados durante a preparação das diferentes versões de preparado.	- 56 -
Tabela 10. Caracterização das esferas produzidas e análise estatística dos parâmetros avaliados.	- 60 -
Tabela 11. Parâmetros avaliados durante a preparação das diferentes versões de preparado.	- 65 -
Tabela 12. Caracterização das esferas produzidas e análise estatística dos parâmetros avaliados.	- 67 -
Tabela 13. Parâmetros avaliados durante a preparação das diferentes versões de preparado.	- 69 -
Tabela 14. Caracterização das esferas produzidas e análise estatística dos parâmetros avaliados.	- 72 -
Tabela 15. Caracterização das esferas produzidas e análise estatística dos parâmetros avaliados.	- 79 -
Tabela 16. Parâmetros avaliados durante a preparação das diferentes versões de preparado.	- 82 -
Tabela 17. Caracterização das esferas produzidas e análise estatística dos parâmetros avaliados.	- 84 -
Tabela 18. Análise sensorial do preparado com 30 % (m/m) queijo para a escolha do aroma a utilizar na produção de esferas de alginato.	- 87 -

Tabela 19. Formulações estabelecidas para a produção de esferas de alginato com sabor a queijo.	- 89 -
Tabela 20. Valores de pH da calda e das esferas armazenadas nesta.	- 93 -
Tabela 21. Resultados qualitativos da análise microbiológica realizada às esferas, após uma semana de armazenamento.	- 95 -
Tabela 22. Resultados qualitativos da análise microbiológica realizada às esferas, após três semanas de armazenamento.	- 97 -

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

PGA	Propileno glicol alginato	
M	Ácido β -D-manurônico	
G	Ácido α -L-gulurônico	
pK _a	Constante de dissociação	
γ	Tensão superficial	(mN/m)
η	Viscosidade	(Pa.s)
ρ	Densidade	(kg/m ³)
d _T	Diâmetro exterior da ponta (extremidade)	(mm)
d _P	Diâmetro esfera cálcio-alginato	(mm)
d _d	Diâmetro da gota líquida de alginato	(mm)
K _{SF}	Fator de redução	
u	Velocidade da gota de líquido de alginato	(m/s)
h	Distância de recolha	(cm)
TSS	Teor em sólidos solúveis	
TPA	Análise perfil de textura (<i>texture profile analysis</i>)	
D _{máx}	Diâmetro máximo das esferas	(mm)
D _{mín}	Diâmetro mínimo das esferas	(mm)
PCA	<i>Plate count agar</i>	
YGC	<i>Yeast Glucose Chloramphenicol Agar</i>	
a _w	Atividade de água	
Alg	Alginato	
CaCl ₂	Cloreto de cálcio	
n	Número de réplicas	
k	Número de médias populacionais ou grupos	
α	Nível de significância	
T	Temperatura da solução alginato original (preparado)	(°C)
T _P	Temperatura de pasteurização	(°C)
t _P	Tempo de pasteurização	(min)
Am.	Amostra	
Ar.	Aroma	

1. INTRODUÇÃO

“Se você consegue criar...E os mercados o adoram...E pode fazer o amor durar...Então você sabe...o que é INOVAÇÃO!”¹

A inovação é a exploração de novas ideias que encontrem aceitação no mercado, usualmente incorporando novas tecnologias, processos e *design*. Inovar é muitas vezes desconfortável para as empresas uma vez que envolve mudança e assunção de riscos. Contudo a sua sobrevivência depende das suas competências para inovar, principalmente em mercados com características de concorrência perfeita onde a homogeneidade dos produtos implica sucessivas reduções nas margens comerciais e em setores sujeitos a turbulência e rápidas mudanças.

Qualquer negócio tem duas exigências básicas: executar as suas atividades correntes para sobreviver aos desafios de hoje e adaptar essas atividades para sobreviver nos dias de amanhã! É neste sentido que as empresas devem caminhar e é apostando na inovação que podem criar valor e diferenciar da concorrência os seus produtos e/ou serviços.

A Frulact – Indústria Agroalimentar, S.A., onde decorreu o estágio curricular no âmbito do Mestrado em Biotecnologia, é sem dúvida um exemplo interessante para todos os *stakeholders* envolvidos no mercado uma vez que tem plena consciência que as ferramentas de Inovação, Investigação e Desenvolvimento são a base do seu sucesso passado, presente e futuro em mercados distintos.

A Frulact surgiu na Maia em 1987 e ao longo do tempo tem apostado na sua expansão em Portugal (Ferro e Tortosendo), Marrocos, França, Argélia e África do Sul (previsão início de atividade Julho 2012). A área de mercado em que atua é a produção de preparados de fruta para aplicação na indústria alimentar nomeadamente laticínios, gelados, pastelaria e bebidas, tendo como meta diária a atingir “Inovar com sucesso”. É neste âmbito que surgem os departamentos de Inovação & Investigação e Desenvolvimento que em parceria com diferentes entidades, nomeadamente Universidades, têm desenvolvido estudos em diversas áreas, tendo sempre o cuidado de desenvolver cada projeto de forma personalizada à medida dos requisitos dos clientes².

O objetivo deste trabalho, desenvolvido integralmente no departamento de Inovação da Frulact em colaboração com o departamento de Química da Universidade de Aveiro, foi estudar e principalmente sistematizar o efeito dos fatores que influenciam a produção e as

características de esferas de alginato. Posteriormente e tendo em consideração os conhecimentos adquiridos, pretendeu-se aplicá-los no desenvolvimento de um novo conceito deste tipo de produto, nomeadamente, esferas de queijo para aplicação em produtos cárneos.

A presente dissertação encontra-se dividida em quatro partes. Na primeira parte são descritos os fundamentos teóricos e o estado atual do conhecimento essenciais para a realização experimental do trabalho e concretização dos objetivos do mesmo, dando-se ênfase a polissacarídeos largamente usados como aditivos na indústria alimentar, os alginatos, nomeadamente às suas propriedades gelificantes e aos fatores que influenciam a produção de esferas de géis de alginato, pois estas são frequentemente usadas como matriz transportadora de moléculas de importância biológica, tais como ingredientes alimentares, enzimas, fármacos, macromoléculas e células microbianas, de plantas e animais. As esferas de géis de alginato são produzidas sobretudo pelo método de gelificação por difusão, cujas variáveis do processo podem influenciar as suas características. Para, além disso, a própria formulação do preparado alimentar é também uma fonte de variáveis e, portanto, todo o sistema deve ser alvo de experiências de forma a encontrar as condições ótimas para a produção de esferas. Deste modo, na segunda parte desta dissertação descreve-se a estratégia experimental definida, mencionando os detalhes de cada uma das etapas do procedimento e procede-se à caracterização dos métodos físico químicos de análise associados ao procedimento experimental. Os resultados obtidos nas diversas experiências realizadas são apresentados e analisados na terceira parte da dissertação, a partir da qual se podem extrair conclusões e estabelecer objetivos e perspectivas para um trabalho futuro (descritas na quarta parte da dissertação) no sentido de otimizar todas as formulações de esferas de alginato produzidas pela Frulact, para que esta consiga surpreender ou satisfazer as necessidades dos seus clientes ainda mais rapidamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. POLISSACARÍDEOS

2.1.1. Classificação e estrutura

Os hidratos de carbono representam um dos macronutrientes básicos e são uma fonte importante de energia. Cumprem funções importantes nos alimentos, nomeadamente atuando como agentes edulcorantes, texturizantes, espessantes, estabilizantes e como precursores de substâncias de aroma e coloração.

Os hidratos de carbono são geralmente divididos em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Os monossacarídeos, frequentemente designados por açúcares, são polihidroxi-aldeídos ou -cetonas, geralmente com uma cadeia carbonada não ramificada, ex. glucose e frutose. Oligossacarídeos são compostos constituídos no máximo por 10 resíduos de monossacarídeos, ex. sacarose, maltose e lactose. Os polissacarídeos consistem em cadeias de monossacarídeos ligados entre si por ligações glicosídicas, mas o número de resíduos de monossacarídeos é, por regra, superior a 10. Devido a este fato, as propriedades destes polímeros de elevada massa molecular são substancialmente diferentes dos restantes hidratos de carbono, nomeadamente não têm um sabor doce e são essencialmente inertes. Exemplos bem conhecidos deste tipo de hidratos de carbono são o amido, a celulose e a pectina³.

Os polissacarídeos (ou glicanos) podem ser constituídos por um só tipo de monómero, homopolissacarídeos (homoglicanos), ou por diferentes tipos de monómeros, heteropolissacarídeos (heteroglicanos). A sua estrutura é determinada similarmente pelos monossacarídeos presentes e pela natureza das ligações entre as unidades de monossacarídeos, e as propriedades físicas (solubilidade, viscosidade e características gelificantes) são principalmente determinadas pelo tipo de ligações⁴.

Os monossacarídeos podem organizar-se em sequências diferentes, o que determina a classificação dos polissacarídeos nos seguintes grupos: perfeitamente lineares (ex. celulose e amilose), ramificados (ex. amilopectina e glicogénio), ramificados em forma de espinha de peixe (ex. celulose alquilada), polissacarídeos com grupos carboxilo (ex. pectina, alginato), polissacarídeos com grupos fortemente ácidos ou esterificados (ex. carragenanas e amido modificado) e modificados³. Evidentemente, estas diferentes estruturas implicarão que os polissacarídeos tenham, de uma forma geral, propriedades distintas.

É ainda importante referenciar que as estruturas primárias dos polissacarídeos podem suceder-se segundo, pelo menos, uma de três sequências: periódica, um período contendo uma ou várias unidades estruturais alternadas (ex. celulose, amilose); a sequência pode conter segmentos curtos ou longos com resíduos periodicamente arranjados separados por segmentos não periódicos (alginato, carragenanas, pectinas); ou a sequência pode não ser periódica ao longo de toda a cadeia (hidratos de carbono componentes das glicoproteínas)³.

2.1.2. Polissacarídeos e o processo de formação de géis

Diversas definições de gel têm sido apresentadas ao longo dos anos pela comunidade científica. No entanto, a definição clássica de gel refere um sistema com propriedades de um sólido, estando presente um largo excesso de solvente. A nível molecular, a gelificação consiste num processo de formação de uma rede contínua tridimensional de macromoléculas, estabelecendo-se interações de diferente natureza entre cadeias de polímeros, permitindo o aprisionamento de uma grande quantidade de solvente⁵.

No que diz respeito aos polissacarídeos, a sua natureza e as várias condições do meio são bastante importantes para a formação de sistemas de diferentes características, nomeadamente géis. Estes podem ter propriedades diferentes, o que os torna de extrema importância na indústria alimentar.

De uma forma geral, o processo de gelificação de polissacarídeos ocorre através da formação de ligações não covalentes entre cadeias ou outras estruturas terciárias, em que intervém mais do que uma cadeia⁶. Este processo origina a formação de um sistema coloidal constituído por dois componentes (disperso e dispersivo) em que o componente disperso, constituído por uma rede tridimensional formada pelas cadeias poliméricas, pode ser visualizado como um sólido que forma uma estrutura interpenetrável, enclausurando o segundo componente, o solvente⁷.

As referidas ligações estabelecem-se de forma localizada entre porções de cadeias livres (ou outras estruturas por elas formadas) de conformação e configuração semelhantes, ou seja, enquanto os segmentos ordenados de uma cadeia se podem associar com os mesmos segmentos de outra cadeia, formando por exemplo uma hélice dupla, os segmentos não periódicos ou desordenados não podem participar nestas associações, como se observa na Figura 1.

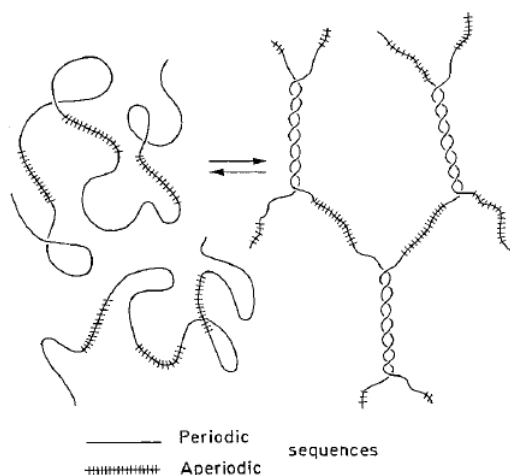


Figura 1. Representação esquemática de um processo de produção de gel³.

Assim, além de ser necessário um comprimento de cadeia crítico de modo a formar a rede do gel, um pré-requisito estrutural essencial para a capacidade de organização em gel é a interrupção de uma sequência periódica e da sua conformação ordenada. A interrupção pode ser alcançada inserindo na cadeia um resíduo de açúcar com uma geometria de ligação diferente, ou seja, estranho à sequência, diferenças de configuração ou conformação, cadeias laterais originando ramificações da cadeia principal, ou substituindo um dos grupos num monômero³. A frequência de ocorrência destas irregularidades determina a densidade e a distribuição das ligações cruzadas, e assim, as suas propriedades de hidratação e porosidade, refletindo-se estas nas propriedades macroscópicas do gel, por exemplo, na viscosidade e turbidez.

As associações entre cadeias durante a gelificação (formação da rede) dão origem, em geral, a aglomerados de maior densidade de cadeias ou grupos de cadeias, denominados zonas de junção. Estas são, muitas vezes, descritas como porções cristalinas no sentido que correspondem a uma zona de estrutura mais ordenada, podendo ocorrer em várias formas, nomeadamente: hélice dupla (Figura 2.a); associação de hélices duplas (Figura 2.b); associação de estruturas em fita, denominada *egg-box* (“caixa de ovos”) (Figura 2.c); outras associações similares (Figura 2.d); ou, finalmente, associação de hélices e fita (Figura 2.e).

A fusão de um gel dá origem a um sistema coloidal que contém macromoléculas livres ou em pequenos aglomerados. Por isso, embora seja muitas vezes denominado *solução*, é

mais correta a designação de *sol* (suspensão de partículas sólidas em líquido) para descrever este tipo de sistema.

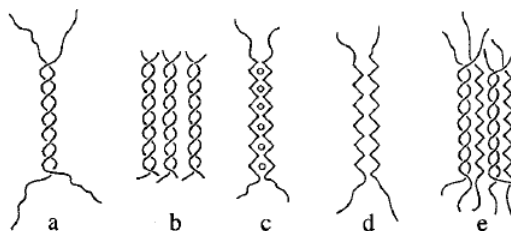


Figura 2. Agregação intercadeias entre conformações regulares³.

a – associação em hélice dupla, b – associação de hélices duplas, c – associação de estruturas em fita, denominada *egg box*, d – associação fita – fita; e – associação de hélices duplas e fitas.

Muitas vezes, algum tempo após a gelificação, ocorre o fenômeno de *sinérese*. Diz-se que um gel sofre sinérese quando, depois de decorridos alguns dias ou mesmo algumas horas após a sua formação, se observa uma separação do solvente da própria malha tridimensional polimérica, a qual exhibe, então, uma diminuição de volume.

2.1.3. Polissacarídeos na formulação dos alimentos

Os polissacarídeos estão naturalmente presentes em muitos produtos alimentares, nomeadamente como substâncias das paredes celulares de frutos e vegetais ou como substâncias de armazenamento de energia para as células (cereais, batatas, legumes)³.

A maioria dos polissacarídeos usados como aditivos e/ou auxiliares de processamento em alimentos é extraída de plantas e de algumas algas. Os amidos e derivados prevalecem entre os polissacarídeos alimentares.

Um hidrocolóide pode ser definido como “um polímero que se pode dissolver ou dispersar na água para dar origem a soluções ou dispersões viscosas e/ou à formação de géis”⁸. Deste modo, a importância dos hidrocolóides encontra-se na capacidade para regular as propriedades físicas/reológicas das misturas alimentares, durante e após o seu processamento. Usados como aditivos garantem a uniformidade e consistência da textura final e fazem realçar não só o aspeto visual, como o paladar e o gosto do produto final, e ainda permitem que o produto tenha um maior tempo de vida.

É fundamental a escolha do, ou dos hidrocolóides mais indicados, para determinada aplicação sem esquecer o aspeto económico do processo. A classificação mais usual, aplicada nos regulamentos legais existentes, agrupa os polissacarídeos em quatro grupos^{8,9}.

- I. Emulsionantes: ajudam a obter uma dispersão de duas ou mais fases que, de outro modo, seriam imiscíveis no produto alimentar;
- II. Estabilizadores: ajudam a manter inalterado o sistema obtido em I;
- III. Espessantes: aumentam a viscosidade do produto;
- IV. Gelificantes: conferem ao produto uma textura específica.

Na Tabela 1 apresenta-se a classificação de alguns polissacarídeos e as respetivas funções mais relevantes nos alimentos.

Tabela 1. Classificação de alguns polissacarídeos segundo propriedades funcionais⁸.

Polissacarídeos	Função		
	Estabilizante	Espessante	Gelificante
Goma guar	-	+	-
Pectina	+	-	+
Alginato	+	+	+
Agar	+	-	+
Carragenanas	+	-	+
Goma xantana	+	+	+

Nota: O símbolo “+” indica que o composto correspondente é utilizado com a função indicada no início da coluna.

Os polissacarídeos são atualmente aplicados em quantidades crescentes na indústria alimentar, embora usualmente com baixos níveis de incorporação nos alimentos. O amido domina os mercados mundiais mas a gama dos outros polissacarídeos aplicada está a aumentar.

A maioria dos hidrocolóides de grau alimentar são solúveis em água e, em consequência, é necessário o controlo das propriedades em fase aquosa dos produtos fabricados (muitos dos quais são multicomponentes, tais como emulsões, espumas e produtos congelados). Com esse propósito, é importante perceber como o hidrocolóide influenciará as questões funcionais no produto final, conhecendo a sua viscosidade/propriedades gelificantes, a cinética da gelificação, como ele é influenciado pela presença de outros hidrocolóides (sistemas mistos), como o processo de produção

influencia as estruturas criadas e as propriedades do sistema formado por essas mesmas estruturas finais¹⁰.

Os principais sectores alimentares que usam hidrocolóides na sua atividade são panificação, pastelaria, confeitaria, lacticínios, sobremesas, produtos de carne, refeições pré-cozinhadas, condimentos e temperos, alimentos para animais¹¹.

De uma forma breve, apresentam-se, de seguida, os polissacarídeos gelificantes mais utilizados na indústria alimentar^{3,12}:

O agar é uma substância gelatinosa obtida das algas vermelhas da classe *Rhodophyceae*; o componente presente em maior quantidade é a agarose e, como tal, as propriedades de gelificação do agar refletem as deste polissacarídeo, sendo os géis formados termorreversíveis e muito firmes, o que numa perspetiva organolética se traduz num gel de natureza quebradiça. As suas aplicações na indústria alimentar baseiam-se no fato de não ser assimilável, formar géis resistentes a temperaturas relativamente altas e ter propriedades estabilizadoras e emulsificantes.

As carragenanas também são extraídas dos elementos da classe *Rhodophyceae* das algas vermelhas, sendo a família das carragenanas constituída por três componentes principais, as carragenanas κ , ι e λ . No que diz respeito ao processo de gelificação, as carragenanas κ e ι formam géis termorreversíveis em água. A sua utilização baseia-se na sua grande tendência para gelificar, aumentar a viscosidade de uma solução, e estabilizar emulsões e várias dispersões.

As pectinas são um componente natural das plantas e são produzidas industrialmente a partir da casca de citrinos e da polpa de maçã. Dependendo do tipo de matéria-prima utilizada são obtidos diferentes tipos de pectinas, de alta metoxilação e de baixa metoxilação, com diferentes graus de esterificação e propriedades específicas. Quanto maior o grau de esterificação das pectinas maior é a velocidade de gelificação. Em geral, pectinas de alta metoxilação formam géis termo resistentes quando o pH é inferior a 3,5 e a concentração de açúcar é elevada (teor em sólidos solúveis superior a 60%). Quando o teor em sólidos solúveis é inferior a 60% é necessário utilizar pectina de baixa metoxilação para a formação de géis¹³. São tradicionalmente usadas na confeção de compotas e geleias, tendo também um efeito estabilizador em gelados e bebidas.

Os alginatos e o seu processo de gelificação são estudados e explorados no âmbito deste trabalho com mais pormenor, nos pontos seguintes.

2.2. ALGINATOS

2.2.1. Introdução

Os alginatos são dos hidrocolóides mais importantes usados na indústria alimentar, e para se perceber esta afirmação, no âmbito deste trabalho irá fazer-se uma análise e descrição exaustiva das suas características, cruciais para as aplicações alimentares.

O termo “alginato” refere-se a um grupo de polissacarídeos naturais que são extraídos de algas marinhas castanhas da classe *Phaeophyceae* (uma variedade de algas marinhas que se desenvolve em águas pouco profundas de regiões temperadas do mundo) onde desempenham um papel estrutural nas paredes celulares. Além disso, também existem como polissacarídeos capsulares em bactérias do solo, sendo deste modo bastante abundantes na natureza¹¹.

A natureza das algas castanhas usadas para a extração do alginato determina a sua química e desse modo as suas propriedades funcionais e a sua aplicabilidade.

Devido à sua capacidade para reter água, propriedades gelificantes e estabilizantes e capacidade para modificar a viscosidade dos sistemas aquosos onde seja incorporado, o alginato é um polissacarídeo usado largamente na indústria alimentar. As outras duas principais aplicações dos alginatos são na área farmacêutica e na indústria têxtil, havendo um grande potencial para o seu uso em aplicações biotecnológicas.

2.2.2. Fontes

O alginato existe na parede celular e nos espaços intercelulares das algas castanhas, como uma mistura de sais de cálcio, magnésio, sódio e potássio. As moléculas de alginato proporcionam flexibilidade e resistência mecânica às algas, características necessárias ao seu crescimento no mar.

Para produção industrial as espécies de algas mais usadas incluem *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia* e *Durvillea*. Para exploração comercial viável, as algas têm de conter pelo menos 20% de alginato, baseado no seu peso seco¹².

A aplicação do alginato pretendida, quer seja como agente espessante, estabilizador ou gelificante, determina qual o alginato a escolher e, assim, a matéria-prima necessária para obter uma eficácia de aplicação ótima.

Bactérias do solo tais como *Azotobacter vinelandii*, *A. crococcum* e várias espécies de *Pseudomonas*, incluindo *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, entre outras, produzem um material polimérico exocelular semelhante ao alginato extraído das algas castanhas. Grupos O-acetil parecem estar invariavelmente presentes nos alginatos bacterianos e são a característica que os distingue dos alginatos provenientes das algas¹⁴. *A. vinelandii* tem evoluído como fonte para produção industrial, mas atualmente todos os alginatos comerciais são extraídos de algas¹¹.

É ainda possível realizar a manipulação das características dos alginatos por fracionamento químico ou por modificação enzimática *in vitro*. Como macromoléculas naturais que são, os alginatos apresentam variabilidade estrutural e de tamanhos, podendo as estruturas sequenciais ser modificadas com a enzima extracelular, polimanurato-C5-epimerase da *Azotobacter vinellandi* para originar polímeros com um elevado conteúdo de ácido gulurónico e, assim, reforçar a capacidade para formar géis com iões cálcio. Estas epimerases, que convertem unidades de ácido manurónico em unidades de ácido gulurónico, foram aceites para a produção de alginatos altamente programados relativamente à composição química e sequência de resíduos de monossacarídeos. No entanto, atualmente esta técnica aparece restrita ao laboratório e nenhum dos polímeros modificados enzimaticamente está comercialmente acessível¹⁰.

2.2.3. Produção de alginatos comerciais

As algas, uma vez recolhidas, podem ser processadas molhadas ou secas. Sendo a *FMC Corporation*, uma empresa que lidera três mercados da área química, nomeadamente Agrícola, Especialidades e Industrial, incluindo a área de biopolímeros, a Figura 3 refere-se ao processo de produção de ácido algínico e dos sais e ésteres comercializados pela *FMC BioPolymer*¹⁵.

Para que a *FMC BioPolymer* consiga produzir alginatos de alta qualidade a partir de algas castanhas, são necessárias mais de 20 etapas de processamento.

A extração do alginato é essencialmente um processo de troca iónica. Numa primeira fase, o alginato insolúvel com uma composição em contra-iões determinada pelo equilíbrio de troca iónica com a água do mar (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , entre outros) é trocado ionicamente com protões, ou seja, é acidificado por extração do tecido moído da alga com ácido mineral.

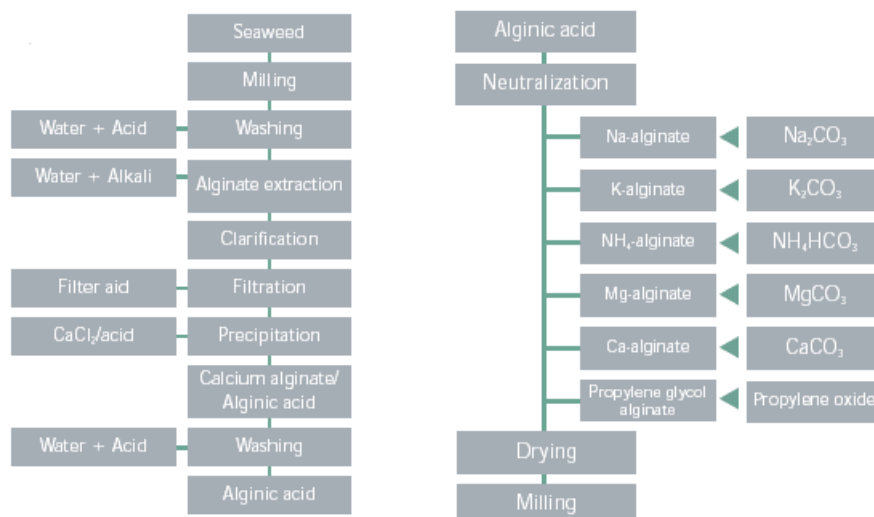


Figura 3. Produção de ácido algínico, de sais e éster comerciais fornecidos pela FMC¹⁵.

O ácido algínico, a forma ácida livre do alginato, é o produto intermediário na produção comercial de alginatos. Tal como as outras formas ácidas livres de polissacarídeos, o ácido algínico tem estabilidade limitada. De modo a tornar estáveis os produtos de alginato solúveis em água, o ácido algínico é transformado na gama de alginatos comerciais com a incorporação de diferentes sais, como indicado na Figura 3.

Esta sequência de eventos garante a produção de produtos relativamente puros, incolores e inodoros. O alginato de sódio é a principal forma de alginato disponível comercialmente, no entanto pequenas quantidades de ácido algínico e sais metálicos são também produzidos.

No caso específico do propileno glicol alginato (PGA), ele é preparado pela reação do óxido de propileno com ácido algínico e, dependendo das condições de reação, é possível que mais de 90% dos grupos carboxílicos ácidos presentes nas cadeias dos ácidos urónicos sejam esterificados, mantendo-se os restantes grupos livres ou neutralizados com sódio ou cálcio. O PGA é um derivado de alginato com importância económica, e está disponível em diferentes graus para diferentes aplicações, por exemplo, há o caso em que ele é solúvel abaixo pH 2 e, na presença de iões cálcio, forma géis moles, elásticos, pouco quebradiços e livres de sinérese³.

Resumindo, os produtos comerciais de alginato com superior interesse são o alginato de sódio, o propileno glicol alginato e o ácido algínico. Em pequenas quantidades são usados os sais de potássio, amónio, cálcio bem como a mistura de sais de sódio e cálcio.

2.2.4. Propriedades dos alginatos

2.2.4.1. Composição e estrutura

Em termos moleculares, alginato é uma família de copolímeros binários não ramificados, ou seja lineares, compostos por unidades de ácido β -D-manurónico (M) e do seu epímero C-5, ácido α -L-gulurónico (G) ligados por ligações glicosídicas do tipo 1 \rightarrow 4, de composição e estrutura sequencial amplamente variável.

Os monómeros ocorrem como regiões compostas exclusivamente por uma unidade ou por outra, ou seja, homopoliméricas, denominadas blocos M ou blocos G, ou como regiões nas quais os monómeros apresentam uma sequência alternada – blocos MG. Estudos revelaram que nos blocos alternados as sequências de GGM e MMG também estão presentes¹¹. Na Figura 4, apresenta-se a estrutura dos blocos constituintes do alginato.

A estrutura secundária de um polissacarídeo refere-se às conformações preferidas por cada unidade monomérica, devido à sua maior estabilidade estereoquímica, e à forma como estas induzem a conformação adquirida ao longo de toda a cadeia polimérica. No que diz respeito às unidades monoméricas constituintes do alginato, o ácido D-manurónico existe na configuração 4C_1 e liga-se no polímero de alginato com as suas unidades vizinhas através das posições 1 e 4. Por sua vez, o ácido L-gulurónico tem configuração 1C_4 e é ligado 1,4 no polímero. Devido às formas particulares dos monómeros e ao seu modo de ligação no polímero, as geometrias das regiões de blocos G, blocos M e regiões alternadas são substancialmente diferentes, nomeadamente, os blocos G estão bloqueados/obstruídos enquanto os blocos M têm uma configuração de fita estendida¹⁴. Na Figura 5, apresenta-se um exemplo de uma cadeia de alginato.

Em geral, as duas unidades monoméricas estão presentes numa razão M/G de 1,5⁽³⁾, mas devido às diferentes razões de monómeros existentes, os alginatos são comumente denominados alginatos *high-M* ou *high-G*.

O comportamento de um alginato em particular depende da sua massa molecular e da proporção e disposição dos monómeros de ácido manurónico e gulurónico presentes, sendo estes aspetos dependentes da variedade de alga marinha da qual o alginato é extraído, ou seja, diferentes algas produzem alginatos que diferem na composição e estrutura, e também das condições sazonais e de crescimento da própria alga. Por exemplo, foi demonstrado

que algas castanhas que crescem em águas geladas produzem geralmente alginatos de massa molecular mais elevada que as que crescem em águas temperadas¹².

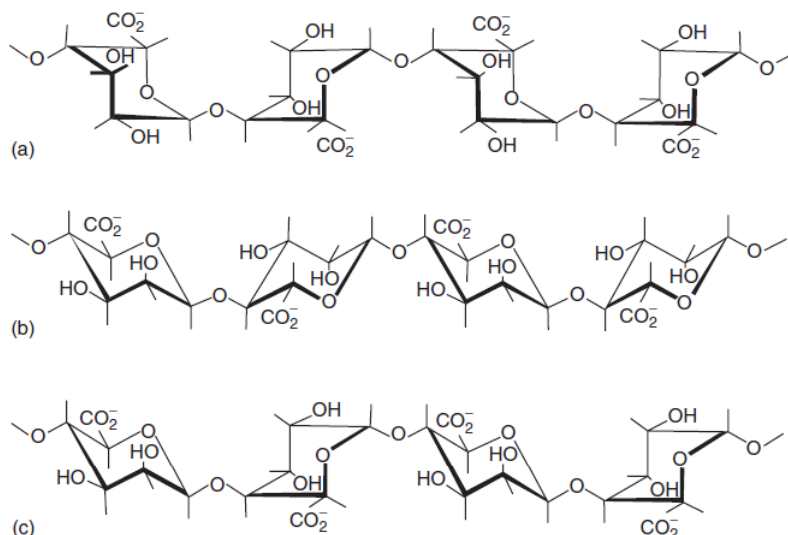


Figura 4. Estrutura dos blocos constituintes do alginato¹².

(a) Ácido L-gulurónico, (b) Ácido D-manurónico, (c) unidades de ácido D-manurónico alternadas com unidades de ácido L-gulurónico.

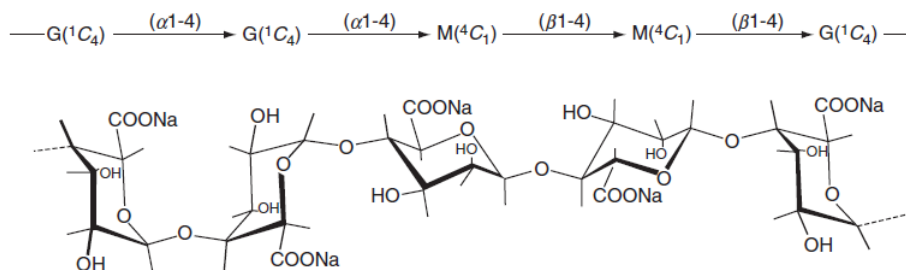


Figura 5. Representação esquemática de uma cadeia de alginato constituída por diferentes arranjos das unidades M e G¹².

2.2.4.2. Massa molecular

Os alginatos, tais como os outros polissacarídeos, são polidispersos em relação à massa molecular e, como consequência, a sua massa molecular será considerada uma média da distribuição das mesmas. A distribuição da massa molecular pode ter implicações no uso dos alginatos, por exemplo, quanto menor a massa molecular dos fragmentos contendo apenas blocos G curtos, menos estes fazem parte na formação da rede do gel e consequentemente não contribuem para a força do mesmo¹¹.

O grau de polimerização de um alginato é uma medida da massa molecular média do polímero e corresponde ao número médio de unidades de ácido urónico por cadeia. As massas moleculares dos alginatos comerciais variam de 32.000 a 200.000, que correspondem a graus de polimerização entre 180 e 930 ⁽³⁾.

2.2.4.3. Viscosidade de soluções aquosas de alginatos

Muitas das aplicações dos alginatos dependem do seu efeito de espessamento, ou seja, da sua capacidade para aumentar a viscosidade dos sistemas aquosos usando concentrações relativamente baixas.

Os alginatos de sódio comerciais são produzidos em várias gamas, e são usualmente descritos como alginatos de baixa, média e elevada viscosidade (referindo-se à viscosidade da sua solução aquosa a 1%).

Quando um sal de ácido algínico solúvel em água começa a hidratar, a viscosidade da solução aumenta, sendo esta determinada pelo tamanho das moléculas de alginato envolvidas. Medições reproduzíveis da viscosidade de soluções de alginato são realizadas usando um viscosímetro do tipo rotacional, uma vez que este é o adequado a líquidos não newtonianos.

Nas concentrações usadas na maioria das aplicações, uma solução de alginato tem características pseudoplásticas, o que significa que a solução flui mais rapidamente quanto mais for agitada ou bombeada (a viscosidade diminui à medida que aumenta a taxa de corte), sendo tal fato consequência do comprimento e da rigidez das moléculas de alginato hidratadas na solução¹⁶.

Para atingir a viscosidade pretendida para uma determinada aplicação, a escolha é realizada entre as várias gamas de viscosidade de alginatos, podendo adicionalmente a concentração de alginato ser ajustada a um nível apropriado para alcançar os requisitos reológicos.

Vários fatores influenciam a viscosidade das soluções aquosas de alginatos^{14,17}, referindo-se de seguida os mais importantes:

a) Massa Molecular

Geralmente a viscosidade de uma solução de alginato está diretamente relacionada com a massa molecular do polissacarídeo, mas esta pode ser significativamente influenciada pelos níveis de resíduos de cálcio resultantes da produção.

Quanto mais elevada for a massa molecular de um alginato solúvel, maior a viscosidade da sua solução. Aquando da produção, a massa molecular pode ser controlada variando a severidade das condições de extração, podendo os produtores comercializar alginatos dentro de várias gamas de viscosidade, como já referido. A perda de viscosidade durante o armazenamento é uma medida da extensão da despolimerização de um alginato.

Alginatos com um elevado grau de polimerização são menos estáveis que aqueles com um baixo grau de polimerização. Alginatos de sódio de baixa viscosidade (até cerca de 50 mPa.s) têm sido armazenados a 10-20°C sem que se observem alterações em três anos. Alginatos de sódio com viscosidade média (até cerca de 400 mPa.s) mostram uma perda de 10% a 25°C e de 45% a 33°C após um ano, e os alginatos de elevada viscosidade são ainda menos estáveis. Os PGA mostram cerca de 40% perdas na viscosidade após um ano a 25°C e também se tornam menos solúveis, sendo o ácido algínico o produto menos estável¹⁷.

b) Temperatura

Os alginatos comerciais devem ser armazenados num local fresco, a temperaturas inferiores a 25°C, uma vez que elevadas temperaturas podem causar despolimerização significativa, o que afeta as propriedades úteis comercialmente, tais como viscosidade e a força do gel.

Nas soluções de alginato, tal como nas de outros polissacarídeos, a viscosidade diminui à medida que a temperatura aumenta, a uma taxa de 2,5% por °C, como se pode observar na Figura 6.

No aquecimento de soluções de alginato de sódio pode ocorrer alguma despolimerização térmica, sendo a quantidade de despolimerização dependente do tempo, temperatura e do pH. Quanto menor o pH, mais rápida a degradação a elevadas temperaturas.

A redução da temperatura causa um aumento da viscosidade na solução de alginato, mas não resulta na formação de gel. Uma solução de alginato de sódio que tenha sofrido

um processo de congelação e posterior descongelação não tem a sua aparência ou viscosidade alteradas.

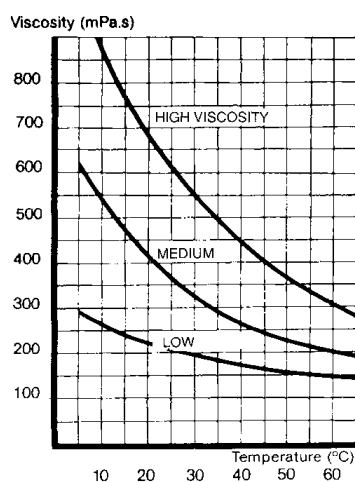


Figura 6. Viscosidade em soluções de alginato 1% a diferentes temperaturas¹⁷.

c) Solventes miscíveis em água

A adição de solventes não aquosos, mas miscíveis em água (ex. álcoois, glicóis, entre outros) a uma solução de alginato resulta num aumento da viscosidade e numa eventual precipitação, apesar de, para isto acontecer os níveis dos solventes adicionados têm que ser bastante elevados.

A fonte do alginato, o grau de polimerização, os catiões presentes e a concentração na solução afetam a tolerância aos solventes da solução de alginato.

d) pH

Quanto menor a massa molecular do alginato mais estável é a solução a baixo pH.

A viscosidade das soluções de alginato não é afetada na gama de pH 5 – 10. Apesar das soluções de alginato de sódio parecerem tolerar pH elevado, a estabilidade a longo prazo é baixa a pH superior a 10 porque ocorre β -eliminação e hidrólise, resultando em despolimerização acompanhada por perda de viscosidade. Abaixo de pH 5, os grupos ionizados COO^- na cadeia começam a ser protonados a $-\text{COOH}$, e a repulsão electrostática entre as cadeias é reduzida, sendo assim capazes de estarem tão próximo que formam ligações de hidrogénio, resultando em viscosidades elevadas.

Quando o pH é ainda mais reduzido, forma-se um gel, usualmente entre pH 3-4. No entanto, se o alginato contém resíduos de cálcio esta gelificação pode ocorrer a pH 5. Se o pH é reduzido rapidamente de pH 6 para 2, forma-se um precipitado gelatinoso de ácido algínico.

O PGA tem menos grupos ionizáveis -COO^- , sendo mais estável a valores de pH ácidos, podendo assim ser usado para espessar e estabilizar produtos alimentares ácidos. A sua solução permanece inalterada até cerca de pH 3, ocorrendo precipitação e formação de gel abaixo deste pH. A estabilidade ácida do PGA aumenta com o grau de esterificação, mas com valores de pH superiores a 6-7 ocorre hidrólise lenta dos grupos éster com consequente perda de viscosidade.

e) Sequestrantes

Os sequestrantes são usados nas soluções de alginato para prevenir que o alginato reaja com iões polivalentes na solução ou para sequestrar o cálcio inerente ao alginato. Os iões polivalentes contaminantes podem existir na água, químicos e pigmentos ou quase em qualquer material de origem natural.

A viscosidade de uma solução de alginato é dependente da massa molecular e do nível de cálcio residual. Os sequestrantes podem ser usados para diminuir a interação entre as cadeias de alginato e catiões polivalentes, controlando assim a viscosidade final das soluções.

f) Sais Monovalentes

A viscosidade de uma solução diluída de alginato de sódio diminui com a adição de sais monovalentes, pois o polímero de alginato contrai-se à medida que a força iónica da solução aumenta.

À medida que a concentração de alginato aumenta o efeito dos eletrólitos diminui, exceto para os alginatos ricos em cálcio. À medida que a concentração dos sais aumenta, a viscosidade da solução pode aumentar, sendo este efeito mais evidente após armazenamento prolongado.

O efeito dos sais varia assim com a fonte do alginato e o grau de polimerização, a concentração em solução e o tipo de sal monovalente usado. O cálcio presente no alginato

pode possivelmente ser substituído por sódio, em soluções de sal de sódio mais concentradas, e esta troca pode ter por si um efeito na viscosidade final da solução.

g) Iões Cálcio

A presença de iões cálcio em baixas concentrações numa solução de alginato irá aumentar a sua viscosidade e grandes quantidades irão causar a formação de um gel. Assim, a adição de iões cálcio é uma forma de aumentar a viscosidade de uma solução sem ter que aumentar a quantidade de alginato dissolvida ou a massa molecular do alginato que está a ser usado.

Por exemplo, de modo a aumentar a viscosidade de uma solução com baixa concentração de alginato, uma pequena quantidade de sais de cálcio ligeiramente solúveis, tais como sulfato de cálcio, tartarato de cálcio ou citrato de cálcio, pode ser adicionada. Os iões cálcio irão reagir com os alginatos, estabelecendo ligações cruzadas com as moléculas, aumentando deste modo a massa molecular e a viscosidade.

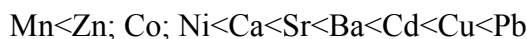
A desvantagem é que as soluções de alginato com iões cálcio mostram uma grande perda de viscosidade com a agitação (são mais sensíveis ao corte que as soluções de alginato sem cálcio). À medida que a concentração de iões cálcio e a viscosidade aumentam, as soluções mudam de pseudoplásticas para tixotrópicas, ou sejam, levam algum tempo para recuperar a sua viscosidade original após serem agitadas.

O efeito do cálcio na viscosidade de um alginato é difícil de prever e usualmente é encontrado experimentando. Depende da composição do ácido urónico e do grau de polimerização do alginato; alginatos com elevada massa molecular e/ou razões elevadas de M/G originam alterações maiores de viscosidade. A forma como a solução é feita, o tipo e a duração da agitação usada na preparação também afetam o resultado de viscosidade final.

2.2.4.4. Ligação/Permuta Iónica

As propriedades dos alginatos para se ligar a iões estão na base das suas propriedades gelificantes. Muitos contra-íões monovalentes (exceto Ag^+) formam sais de alginato solúveis, enquanto os divalentes e multivalentes (exceto Mg^{2+}) formam géis ou precipitados.

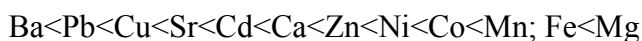
A afinidade dos alginatos para os cátions multivalentes depende da sua composição, seguindo-se a seguinte série, denominada de Thiele¹²:



Demonstrou-se que as características de afinidade são uma propriedade exclusiva dos blocos poliguluronato, e que os blocos de polimanuronato e os alternados não tinham praticamente seletividade¹¹.

A seletividade dos alginatos para os cátions multivalentes é também dependente da composição iónica do gel de alginato, como a afinidade relativamente a um ião aumenta com o aumento do conteúdo do ião no gel.

A série seguinte representa a sequência crescente para os valores de concentração do cátion que origina um máximo de viscosidade num sistema de alginato¹²:



A eficiência de um ião divalente como precipitante de alginatos não depende apenas da sua afinidade para o alginato, mas também da quantidade de ião que deve ser ligado ao alginato para a formação do gel. Assim, as sequências encontradas não são exatamente as mesmas, indicando a importância de dois fatores distintos como origem do aumento da viscosidade e, portanto, da gelificação do sistema.

2.2.4.5. Solubilidade

Em geral, existem três parâmetros essenciais que determinam a solubilidade dos alginatos em água, nomeadamente: o pH do solvente (devido à necessidade de cargas electrostáticas nos resíduos de ácido urónico), a força iónica do meio (efeitos *salting-out* dos cátions não gelificantes) e, em misturas de solventes, o efeito das constantes dielétricas nos coeficientes de actividade dos iões¹¹.

As constantes de dissociação (pK_a) dos monómeros de ácido manurónico e gulurónico são 3.38 e 3.65, respetivamente¹¹. O valor de pK_a dos alginatos é apenas ligeiramente distinto do dos monómeros, dependendo da força iónica do solvente e da concentração de alginato, sendo que um aumento na força iónica diminui a dependência da concentração do pK_a do polímero.

As soluções de alginato podem comportar-se de duas maneiras fundamentalmente diferentes quando o pH da solução diminui. Uma diminuição abrupta no pH causa a precipitação das moléculas de ácido algínico, enquanto uma libertação lenta e controlada

de prótons pode resultar na formação de um gel de ácido algínico. No ponto 2.2.4.3d) encontram-se descritos os efeitos do pH nas soluções de alginato, em mais detalhe.

Quanto ao efeito da força iônica, qualquer alteração deste parâmetro tem, geralmente, um profundo efeito no comportamento do polímero, especialmente na extensão da sua cadeia e consequentemente na viscosidade da solução, afetando também a solubilidade.

Se se pretender aplicar os alginatos na presença de elevadas concentrações de sais, estes devem ser antes completamente hidratados em água pura, seguindo-se a adição do sal, utilizando agitação mecânica.

2.2.4.6. Estabilidade

O alginato de sódio puro, seco e pulverizado pode ter um prazo de validade de vários meses, se armazenado em local seco, fresco e sem exposição à luz solar. Se congelado, pode manter-se por longos períodos de tempo sem redução significativa da sua massa molecular. Por sua vez, o ácido algínico seco tem uma estabilidade limitada a temperaturas normais devido à degradação intramolecular catalisada por ácido.

Para muitas aplicações é importante estar consciente dos fatores que determinam e limitam a estabilidade das soluções aquosas de alginato.

Em soluções de alginatos comerciais podem desenvolver-se microrganismos porque usualmente os alginatos contêm compostos nitrogenados e sais. O crescimento de bactérias ou fungos pode causar despolimerização e perda de viscosidade do alginato bem como contaminação e deterioração de qualquer produto no qual o alginato seja usado. Deste modo, os produtos alimentares são normalmente protegidos por conservantes tradicionais, tais como ácido ascórbico, sorbato de potássio, ácido benzoico, entre outros.

2.3. PROCESSO DE GELIFICAÇÃO DOS ALGINATOS

A formação fácil e quase instantânea de géis iônicos de alginatos, na presença de cátions adequados, constitui uma das suas propriedades mais importantes. O efeito do ião cálcio tem sido o mais estudado nas aplicações alimentares, devido à sua importância biológica.

A principal propriedade determinada pela distribuição da estrutura em bloco é a capacidade dos alginatos para formar géis. A principal vantagem dos alginatos como formadores de géis é a sua habilidade para formar géis termicamente estáveis.

2.3.1. Mecanismos de gelificação

2.3.1.1. Géis alginato-cálcio

De forma a reagir com o cálcio para formar um gel, o alginato tem que conter uma certa proporção de ácido gulurónico, e estes monómeros devem estar em série. As regiões de ácido poligulurónico de uma molécula de alginato são ligadas a uma região similar de outra molécula de alginato, por meio dos catiões cálcio.

A capacidade para formar géis e a força do gel resultante está bastante relacionada com a quantidade e o comprimento médio dos blocos G. Um elevado conteúdo de blocos G e longos blocos G originam alginatos com elevada reatividade ao cálcio e com um elevado potencial para formar géis.

O catião divalente Ca^{2+} encaixa-se nas estruturas dos resíduos de ácido gulurónico, tipo um ovo numa caixa de ovos. O mecanismo da formação do complexo envolve a interação do cálcio com diferentes átomos de oxigénio, de duas unidades de ácido gulurónico adjacentes, em ambas as cadeias envolvidas na ligação do cálcio, como adotado no modelo *egg-box* (caixa de ovos), representado na Figura 7.

Deste modo, o mecanismo da formação do gel baseia-se nas reações intra- e intermoleculares do catião cálcio com as moléculas de alginato. Formam-se ligações cruzadas entre os grupos carboxilo e os iões cálcio, mas estes também interagem com os átomos de oxigénio eletronegativos dos grupos hidroxilos.

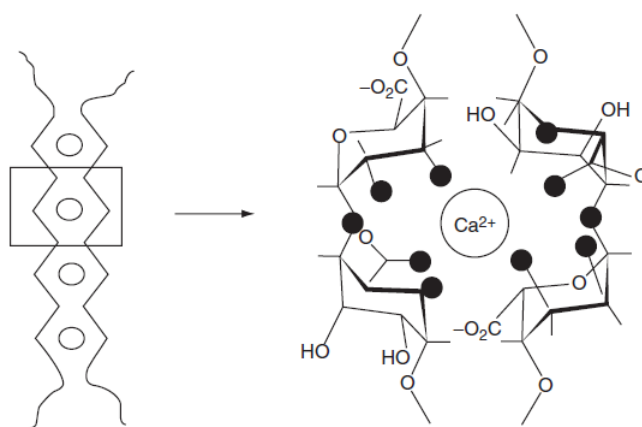


Figura 7. Interação específica do cálcio com caixas de blocos de ácido gulurónico¹².
Os círculos pretos representam os átomos de oxigénio envolvidos na coordenação do íon cálcio.

O mecanismo de gelificação inicia-se pela associação entre cadeias que contêm sequências de poliguluronato formando dímeros (as cadeias parecem adotar uma estrutura em fita incorporando os cátions divalentes de tamanho adequado) terminando este processo no momento em que a quantidade de Ca^{2+} é de cerca de 50% da concentração estequiométrica. Posteriormente ocorre a associação dos dímeros, para a qual a quantidade de Ca^{2+} necessária se aproxima de 100%, com o aumento do tamanho do agregado. Finalmente, para valores de concentração de Ca^{2+} correspondentes a quantidades estequiometricamente superiores a 100%, poderá ocorrer associação do cátion a sequências alternadas de ácido manurônico e gulurônico e mesmo a sequências de ácido manurônico. Nestas condições, a presença de quantidades elevadas de Ca^{2+} induz a formação de agregados de dimensões elevadas, que podem mesmo originar a precipitação do polímero. Eventualmente, a cada agregado deverá ligar-se 150% da quantidade estequiométrica requerida de Ca^{2+} , uma vez que ambas as faces exteriores do aglomerado estarão, também, associadas a cátions^{7,12}. O modelo para o processo de gelificação de alginatos encontra-se representado na Figura 8.

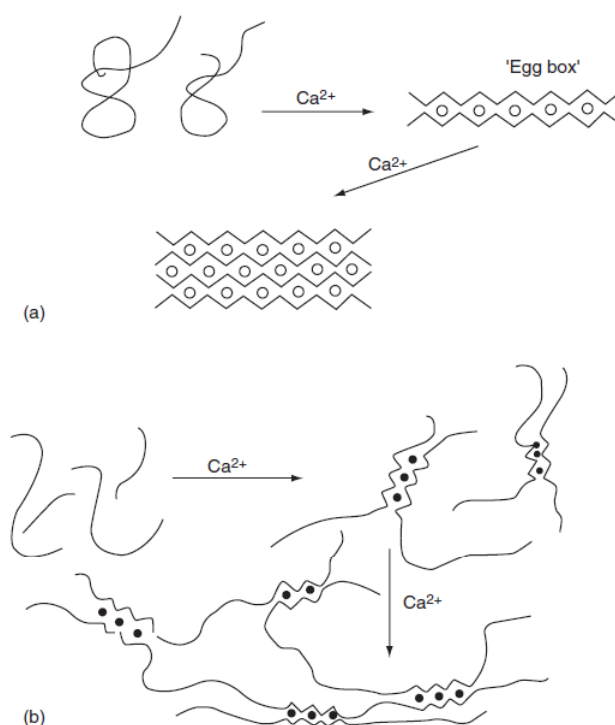


Figura 8. Mecanismo de interação cooperativa entre o cálcio e o alginato¹².

a: Modelo *egg-box* – interação cálcio com bloco ácido gulurônico; b: Associação de cadeias levando à gelificação, induzida pelo envolvimento do cálcio numa caixa de blocos de ácido gulurônico.

Um gel de alginato pode ser imaginado com uma parte sólida e outra parte em solução, representando as zonas de junção o estado sólido.

Após a gelificação, as moléculas de água estão fisicamente aprisionadas pela matriz ou rede de alginato mas continuam livres para migrar, tendo este fato consequências importantes em muitas aplicações. A capacidade do gel para reter a água resulta de forças capilares¹⁶.

2.3.1.2. Géis ácido algínico

Os alginatos podem formar géis a valores de pH inferiores aos valores de pK_a dos resíduos de ácidos urónicos. No entanto, esta preparação tem que ser realizada com cuidado, porque a adição direta de ácido à solução de alginato de sódio pode levar a uma precipitação instantânea em vez da formação de um gel. Uma diminuição controlada do pH pode ser realizada convenientemente pela adição lenta de lactonas hidrolisáveis, tais como, D-glucono- δ -lactona (GDL)¹¹.

Os géis de ácido algínico são formados de maneira semelhante aos géis de alginato de cálcio, ou seja, pelo envolvimento das zonas de junção quando são adicionados prótons a uma solução de alginato. Neste tipo de ácidos, as ligações de hidrogénio formadas entre as regiões homopoliméricas de moléculas de alginato adjacentes são protonadas para formar as zonas de junção, mas para que estas sejam estáveis têm que ser criadas um número mínimo de ligações intermoleculares consecutivas¹⁶.

Como no caso dos géis de alginato de cálcio, os blocos G são os mais efetivos na construção das zonas de junção mas as sequências de polimanuronato também suportam a formação de géis ácidos. As características dos géis de ácido algínico parecem ser menos dependentes do processo de formação, em contraste com os géis de alginato de cálcio.

2.3.1.3. Géis propileno glicol alginato

Propilenos glicol alginatos não são bons formadores de géis. Os grupos de propileno glicol impedem a agregação das cadeias de alginato e poucos grupos estão então disponíveis para a interação com os catiões. A reação com o cálcio depende do grau de esterificação: até 60% formam-se géis fracos, acima de 85% não existe alteração da viscosidade na presença de cálcio¹⁴.

2.3.2. Preparação de géis alginato-cálcio

A formação de um gel de alginato é mais complexa que a simples adição de iões cálcio a uma solução de alginato. Os alginatos são capazes de produzir géis com texturas e resistências variadas, adequadas a uma gama alargada de aplicações, mas para se criar as formulações corretas tem que se balancear os seguintes pontos^{11,14,16,17}:

1) Tipo de alginato usado

Em geral, alginatos ricos em resíduos de guluronato, *high-G*, formam géis fortes e quebradiços, enquanto os alginatos *high-M* formam géis macios e mais elásticos. Além disso, os alginatos ricos em resíduos M sofrem sinérese em extensão superior aos alginatos ricos em resíduos G, mediante gelificação com iões cálcio.

2) Grau de conversão a alginato de cálcio

O termo *conversão de cálcio* refere-se à proporção de iões cálcio para alginato de sódio. Uma razão molar de 0.5 (onde teoricamente há cálcio suficiente para substituir totalmente o sódio) é expressa com uma *conversão de cálcio* de 100%.

A introdução de uma pequena quantidade de cálcio provoca um aumento na viscosidade e à medida que a proporção aumenta, a solução torna-se mais viscosa e desenvolve alguma estrutura de gel. Adições posteriores de cálcio resultam num aumento da resistência do gel, mas a determinado ponto o gel torna-se tixotrópico, ou seja, quando sujeito a tensão de corte torna-se fluído, retomando à sua condição inicial quando imóvel. Se após esta situação, ainda for adicionado mais cálcio, produzem-se géis irreversíveis, suspensões ou flocos dependendo do método de adição.

Como a afinidade do cálcio para os blocos G é muito superior que para os blocos MG ou M, o cálcio disponível irá combinar-se preferencialmente com os blocos G, e apenas se houver um excesso de cálcio, este se irá combinar com as restantes partes da molécula. Com um alginato que tenha uma proporção menor de blocos G, o cálcio em excesso não será tão efetivo na agregação das moléculas quando sujeito a forças de corte elevadas.

Para alginatos *high-M*, formam-se géis tixotrópicos a níveis de cálcio que, num alginato com uma proporção elevada de blocos G, estariam a manter as cadeias de alginato numa estrutura permanente de gel.

3) Fonte de íons cálcio e método de preparação do gel

O melhor tipo de sal de cálcio para a gelificação de alginatos depende do método escolhido para a preparação do gel e do pH do produto final.

Os géis de alginato podem ser preparados essencialmente por dois métodos:

I. Método de gelificação por Difusão

O método de gelificação por difusão é o mais simples. Neste método a solução de alginato, ou uma mistura contendo alginato, é dividida e mergulhada numa solução de sal de cálcio, ou pulverizada com a solução desse catião, como nas configurações apresentadas na Figura 9.

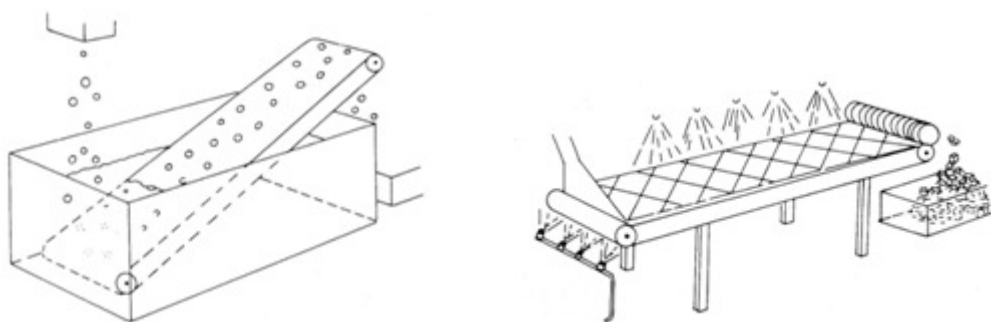


Figura 9. Configurações para o método gelificação por difusão¹⁶.
Esquerda – Banho de cloreto de cálcio; Direita – *Spray* de cloreto de cálcio

A fonte mais comum de íons cálcio para este método é o cloreto de cálcio. Os íons cálcio difundem-se para a mistura contendo alginato, formando um gel de alginato de cálcio quando os íons cálcio reagem com o alginato.

Uma vez que o processo de difusão é lento, geralmente só é aplicado eficazmente para a produção de fitas finas ou pequenas esferas, ou para proporcionar um revestimento fino na superfície de um produto.

O processo de difusão pode ser acelerado aumentando a concentração de cálcio, no banho ou no *spray*, e usando um alginato extremamente reativo ao cálcio, ou seja, um alginato com uma elevada proporção de blocos G. É importante salientar que o aumento da concentração de cloreto de cálcio tem limites, uma vez que este em excesso confere um sabor desagradável e amargo aos produtos alimentares.

Quando uma solução de alginato é difundida e gelificada, num banho contendo cálcio, a escolha do sal de cálcio não é afetada pelo pH do sistema de alginato. Contudo, para sistemas ácidos, a gelificação por difusão também pode ocorrer depositando um alginato (contendo um sal de cálcio solúvel apenas sob condições ácidas) num banho ácido. A difusão do ácido para a mistura resulta na solubilização do sal de cálcio e na subsequente gelificação.

É importante referir que a difusão é um processo de duas vias, isto é, enquanto os iões cálcio se difundem para o sistema de alginato, o material solúvel está a difundir-se para fora do alginato (para o banho) ao mesmo tempo. Por exemplo, se o objetivo é preparar um gel de alginato contendo um nível elevado de açúcar, então o banho deve conter uma concentração de açúcar equivalente, bem como cálcio.

Este método tem sido principalmente utilizado para a produção de géis de alginato na indústria alimentar (bagas artificiais ou outros alimentos reestruturados) e na área da biotecnologia (esferas de gel com propósitos de imobilização de células ou enzimas).

Normalmente, na área alimentar, a produção de esferas de alginato é realizada misturando alginato de sódio aquoso com polpa de alimentos (ou, para propósitos de imobilização, com uma suspensão de células) e posteriormente procedendo ao gotejamento da mistura numa solução de iões cálcio. A dimensão das esferas obtidas pode ser controlada pela configuração do dispositivo de extrusão, pela viscosidade da mistura de alginato e pela aplicação de diferentes equipamentos para a formação de esferas.

II. Método gelificação Interna

No processo de gelificação interna, que normalmente é realizado à temperatura ambiente, o cálcio é libertado sob condições controladas no interior do sistema.

As fontes mais comuns de iões cálcio utilizadas neste método são o sulfato de cálcio e o carbonato de cálcio. A taxa à qual o cálcio é disponibilizado para as moléculas de alginato depende principalmente do pH e das características do sal de cálcio, nomeadamente quantidade, tamanho das partículas e solubilidade. Partículas pequenas e pH baixo, favorecem a rápida libertação do cálcio.

Na maioria das situações, a libertação do cálcio é tão rápida durante a mistura dos ingredientes, que é necessário o uso de um sequestrante de cálcio (ex. fosfato, citrato ou EDTA) para controlar a reação, competindo com o alginato pelos iões cálcio livres,

prevenindo a pré-gelificação do alginato durante o tempo da mistura do produto. Quanto mais rápida for a mistura, menor a quantidade de sequestrante necessária.

O processo deve ocorrer a pH neutro ou ácido. A acidez pode ser obtida adicionando um acidulante, que irá acelerar a solubilidade dos sais de cálcio.

Os dois métodos descritos anteriormente podem ser combinados, originando rapidamente uma membrana externa ou um revestimento gelificado, antes que os produtos se juntem, devido à libertação lenta de cálcio.

Um outro método que pode ser usado é a *gelificação por arrefecimento*. Neste processo, o alginato é dissolvido em água juntamente com um baixo nível de sal de cálcio e de sequestrante e mantido quente. A temperatura elevada previne a gelificação porque as cadeias de alginato estão em agitação térmica, o que dificulta a associação das mesmas. Posteriormente, a solução é arrefecida e origina um gel de alginato de cálcio, termicamente estável. Com uma formulação cuidada, os géis podem ser formados na gama de temperaturas entre 0-50°C, mas este processo é limitado a texturas relativamente moles.

2.3.2.1. Homogeneidade dos géis

Os géis de alginato preparados pelo método de difusão exibem frequentemente uma heterogeneidade de concentrações, ou seja, a concentração de polímero é consideravelmente mais baixa no centro do gel do que nas extremidades. Quando os iões metálicos divalentes se difundem numa solução de alginato, a ligação rápida e a formação de uma rede produz interiormente zonas de gelificação que se movem. O alginato difunde-se do centro do gel para estas zonas, levando à diminuição da sua concentração no centro.

A homogeneidade do gel pode ser controlada fazendo uma seleção cuidada da massa molecular e da concentração do alginato, juntamente com a concentração de iões gelificantes e não gelificantes. Em geral, alginatos de baixa massa molecular, uma baixa concentração de iões gelificantes e a ausência de iões não gelificantes dá origem a situações de heterogeneidade, enquanto alginatos de elevada massa molecular, uma concentração elevada de iões gelificantes e não gelificantes originam situações de homogeneidade¹¹. No entanto, ambas as situações podem ser vantajosas dependendo da aplicação para a qual o gel de alginato é pretendido.

2.3.2.2. Cinética da gelificação

Enquanto a ligação dos catiões multivalentes a um sítio de ligação na cadeia de alginato é muito rápida, a construção da estrutura em rede para formar o máximo número possível de *egg-box* entre resíduos de guluronato é provavelmente mais lenta. Após o catião ter induzido a dimerização aleatória dos blocos G, é necessário que ocorra alguma dissociação, saliente-se cineticamente desfavorável, das zonas de junção para formar uma rede de blocos diméricos, perfeitamente alinhados na rede.

Nos géis preparados pelo método de difusão, a velocidade da formação da rede é gerida pela taxa de difusão dos iões para o interior da solução de alginato, enquanto nos géis preparados pelo método de gelificação interna a velocidade é determinada pela taxa de hidrólise da lactona (GDL) e a taxa de dissolução do sal de cálcio¹¹.

Como já referido, quando se trabalha com géis de alginato é importante considerar a possível ocorrência de *sinérese*, pela qual o gel passa durante e após a gelificação. No caso dos géis preparados por difusão, é usado um excesso de catiões divalentes, sendo a sinérese dependente da quantidade e da sequência de monómeros no alginato. Relativamente aos géis formados por gelificação interna, a sinérese pode ser controlada limitando a quantidade de iões cálcio adicionados ao sistema. Se as quantidades de sais de cálcio e resíduos de guluronato forem aproximadamente equivalentes, a sinérese pode ser totalmente evitada.

Estudos do fenómeno de sinérese em géis de alginato de cálcio divulgam níveis reduzidos de sinérese com a diminuição da massa molecular do alginato e, adicionalmente, que este fenómeno também é atenuado quando frações de alginatos com elevada massa molecular são substituídas por moléculas de alginato curtas, enriquecidas em resíduos de guluronato¹¹. Deste modo, é importante haver informação acerca da massa molecular e da flexibilidade dos segmentos elásticos, de forma a prever o grau de sinérese nos géis de alginato.

2.3.2.3. Força do gel

Em geral, o módulo de elasticidade de um gel de alginato depende do número e da força das ligações cruzadas e do comprimento e rigidez das cadeias entre essas ligações. O módulo depende do catião, já que a força do gel aumenta com a afinidade entre o polímero

e o catião. Alguns autores afirmam que a energia usada para a deformação do gel origina o rompimento das zonas de junção, suportando a teoria que o aumento do módulo pode ser causado pelo aumento da força nas zonas de junção e/ou pelo aumento do número de ligações cruzadas¹¹.

O módulo de elasticidade dos géis de alginato produzidos pelo método de difusão aumenta com a massa molecular até um valor médio de 80.000 g/mol, após o qual se torna independente. No caso dos géis preparados pelo método gelificação interna, existem aumentos no módulo com a massa molecular, para alginatos com massas moleculares tão elevados como 300.000 g/mol¹¹.

Para estabelecer as diferenças entre géis, normalmente realizam-se medições de algumas propriedades, sendo a mais comum a força do gel, muitas vezes usada como um indicador da qualidade de um alginato. De forma geral, a estrutura de um gel pode ser estudada de forma aprofundada utilizando métodos de caracterização reológica e a natureza viscoelástica dos géis de polissacarídeos pode ser determinada através de medições dinâmicas baseadas em experiências utilizando pequenas oscilações de deformações de corte^{11,18}.

2.3.3. Aplicações dos géis de alginato na área alimentar

Os alginatos, e em geral os polissacarídeos derivados de algas, são aceites para uso como aditivos alimentares e também são usualmente reconhecidos como seguros (*GRAS*) pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) e pela Comunidade Europeia, estando também listados na *U.S Food and Agriculture Organization* (FAO) e no *Codex Alimentarius*. Estão inscritos no Anexo I do Decreto-Lei nº 121/98, sendo deste modo considerados “aditivos alimentares genericamente autorizados para uso em géneros alimentícios, com exceção dos referidos no nº 3 do artigo 4º, de acordo com o princípio *quantum satis*”⁹.

De forma genérica, os alginatos são usados como aditivos alimentares para melhorar, modificar e estabilizar a textura de determinados alimentos, e as suas principais capacidades consistem em atuar como agente espessante, gelificante, estabilizante, por exemplo de misturas aquosas, dispersões e emulsões e, formador de filme/revestimento.

Algumas destas capacidades advêm das propriedades físicas inerentes dos alginatos, mas também podem resultar de interações com outros componentes do produto alimentar,

por exemplo, proteínas, gorduras ou fibras. É importante notar que o alginato é polieletrólito, implicando que sob condições favoráveis, pode interagir electrostaticamente com outros polímeros carregados (ex. proteínas) em sistemas mistos, resultando numa transição de fase ou num aumento da viscosidade^{11,14}. Este tipo de interações pode ser utilizado para estabilizar e aumentar as propriedades mecânicas de alguns alimentos reestruturados e alimentos para animais.

O único derivado de alginato usado na indústria alimentar é o PGA uma vez que em contraste com o alginato, possui funcionalidades desejáveis mesmo em condições de pH baixo. A presença dos grupos éster propileno glicol lipofílicos origina PGA com poder emulsionante e torna-o tolerante à acidez e menos reativo ao cálcio, que o alginato de sódio original. Os restantes grupos ácidos não esterificados retêm alguma da carga negativa, mesmo abaixo de pH 2.75, e participam nas ligações cruzadas fracas, mas importantes, com o cálcio ou proteínas, que a baixo pH têm carga negativa. Estas propriedades do PGA são assim utilizadas em várias aplicações, nomeadamente, que impliquem condições ácidas^{11,16,19}.

Na Tabela 2 são listadas, de forma geral, as aplicações dos alginatos na indústria alimentar.

Tabela 2. Áreas e aplicações dos alginatos na indústria alimentar (adaptada de Imeson, 1997¹⁶)

Área	Alimento
Alimentos reestruturados	Anéis de cebola
	Recheios de pimentos para azeitonas
	Recheios de frutas
Alimentos para animais (rações)	Carne, peixe e frango
	Pedaços de alginato gelificados
Gelados	Gelados
	Frutas geladas
Geleias e Marmeladas	Iogurte com mistura de frutas
	Geleia com baixo teor de açúcar
Molhos e Emulsões	Marmelada de luxo
	Molhos para saladas
	Maionese
	<i>Ketchup</i> , molho de tomate
Sobremesas e produtos lácteos	Margarinas com baixo teor em calorias
	Sobremesas instantâneas
	Gelatina, pudins
Toppings, molhos e xaropes	-----
Bebidas	Cervejas
	Sumos, polpas
	Licores
Biotechnologia	Imobilização de bactérias, leveduras e enzimas
Rações (parte processada algas marinhas)	Alimentos para peixes

2.3.3.1. Encapsulamento de moléculas de importância biológica

O encapsulamento pode ser definido como um processo para confinar compostos ativos dentro de uma matriz em forma de partículas, para alcançar um ou mais efeitos desejáveis. As partículas podem ser usadas para imobilização, proteção ou estabilização, libertação controlada das moléculas aprisionadas e alteração das propriedades do produto²⁰.

As esferas de géis de alginato são frequentemente usadas como matriz transportadora de moléculas de importância biológica, tais como ingredientes alimentares, enzimas, fármacos, macromoléculas, células microbianas, células de plantas e células animais²¹.

Nos últimos anos, emergiu uma quantidade considerável de informação devido à enorme popularidade que os alginatos alcançaram como matriz de imobilização de células vivas. O aprisionamento de células dentro de esferas de alginato de cálcio tornou-se a técnica mais usada para a imobilização de células vivas. Este procedimento de imobilização pode ser realizado num simples passo, sob condições muito suaves e assim compatíveis com a maioria das células. A suspensão de células é misturada com uma solução de alginato e a mistura é gotejada para uma solução contendo catiões multivalentes (usualmente Ca^{2+}). As gotas formam instantaneamente esferas de gel que aprisionam as células numa rede tridimensional de alginato reticulado ionicamente¹⁰. Os possíveis usos deste sistema na indústria alimentar e farmacêutica, medicina e agricultura são numerosos.

A nível biomédico várias aplicações podem ser referidas nomeadamente libertação/administração controlada de medicamentos, pensos/curativos com base de alginato para uso em feridas agudas e crónicas, sistemas modelo de cultura de células de mamífero para estudos biomédicos, regeneração de diferentes tecidos e órgãos usando os géis de alginato como veículo fornecedor de proteínas ou populações de células²².

Na indústria alimentar alguns exemplos relevantes de aplicações são a imobilização de células de leveduras em esferas de alginato para a produção de etanol e cerveja, bem como na fermentação secundária do champanhe¹⁶, imobilização de indicadores microbiológicos numa matriz de alginato e polpa de alimentos para validação biológica quando não é possível efetuar medições de temperatura²³, revestimentos antimicrobianos/bioativos baseados em alginato para aumentar a segurança e qualidade alimentar²⁴, entre outros.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Estratégia de desenvolvimento experimental

Na indústria alimentar, a produção de esferas de alginato é realizada misturando alginato de sódio aquoso com polpa de alimentos e posteriormente procedendo ao gotejamento da mistura numa solução de íões cálcio, ou seja, utilizando o método de gelificação por difusão (Figura 10).

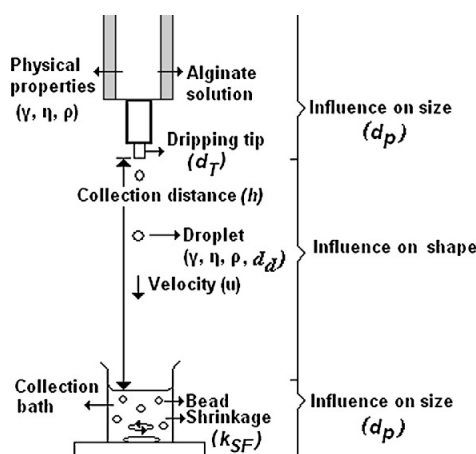


Figura 10. Esquema das variáveis de processo envolvidas na formação de esferas de alginato de cálcio²⁰.

Os aspetos críticos da produção de partículas de alginato, nomeadamente tamanho e a sua distribuição, forma, propriedades de transporte de massa, biocompatibilidade, solubilidade, estabilidade mecânica e química, são bastante dependentes das aplicações.

As qualidades transportadoras podem ser influenciadas pela composição e concentração de alginato, a presença de impurezas, o tipo e a concentração de íões gelificantes e não gelificantes, bem como pelas condições do processo de produção. Todos estes aspetos são importantes para a produção de partículas de alginato de cálcio com baixa polidispersidade e o mais esféricas possível²⁰.

Apesar do método de gelificação por difusão já ser usado há muitos anos, a formação de esferas com o tamanho e a forma desejados exige muitas vezes experiências de “tentativa e erro” na formulação das soluções utilizadas e na configuração experimental (ex. viscosidade da solução, tensão superficial, configuração do dispositivo de extrusão, distância de recolha, entre outros).

Com base no estudo apresentado e no âmbito do Mestrado em Biotecnologia da Universidade de Aveiro realizaram-se experiências laboratoriais na Frulact, S.A para tentar correlacionar as propriedades do alginato e as condições experimentais, com as características das esferas obtidas. A segunda fase do trabalho debruçou-se sobre o desenvolvimento de novos produtos tendo como ponto de partida o conceito de esferas de alginato e os conhecimentos práticos obtidos na primeira fase do trabalho.

3.1.1. Gelificação por difusão – Estudo do efeito das variáveis do processo

3.1.1.1. Formulação base

Para o estudo foi utilizada como referência a formulação apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Formulação base utilizada na realização dos ensaios.

Descrição matéria - prima	% (m/m)
ÁGUA FRIA	41,55
CORANTE CARMIM MICROENCAPSULADO	0,35
CONC. SUMO FRAMBOESA CL 65BX (X9,3)	5,70
SORBATO POTÁSSIO GRANULADO (E202)	0,10
AÇÚCAR	48,00
AMIDO NATIVO DE MILHO	2,40
ALGINATO PROTANAL LF 20/40	0,50
CITRATO TRISODICO E 331 (III)	1,40

3.1.1.2. Preparação das esferas de alginato

A produção das esferas de alginato necessárias para os ensaios de caracterização em cada uma das etapas do estudo foi realizada segundo o procedimento experimental geral apresentado na Figura 11.

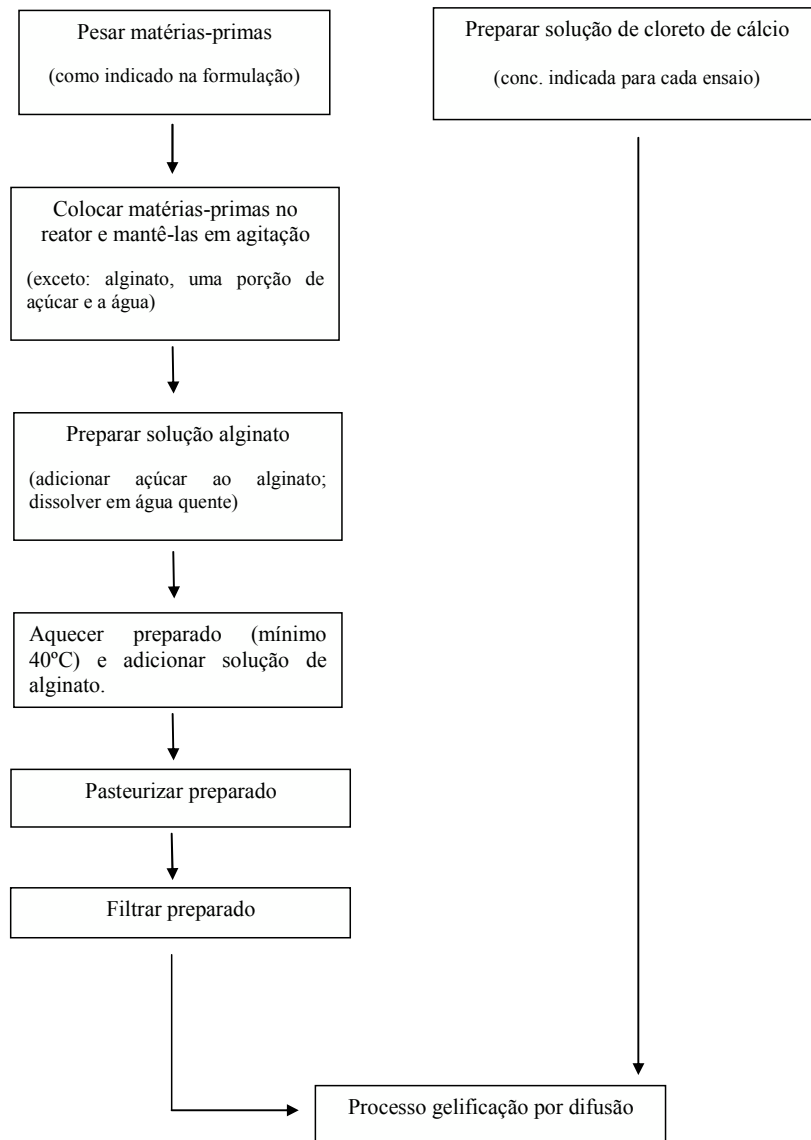


Figura 11. Esquematização geral do procedimento experimental.

3.1.1.3. Descrição das diferentes etapas

Nas várias etapas do trabalho avaliou-se a influência de fatores distintos na produção de esferas de alginato.

A primeira etapa do estudo consistiu em avaliar a influência da concentração de alginato e da concentração de cloreto de cálcio na produção de esferas de alginato. As diferentes versões de esferas foram produzidas fazendo variar em cinco níveis a concentração de alginato de sódio, nomeadamente entre 0,4 e 1,5 % (m/m) na formulação apresentada na Tabela 3 e a concentração da solução de cloreto de cálcio sobre a qual se processa o processo de gelificação por difusão do preparado entre 0,5 e 3,0 % (m/m).

Adicionalmente, para se avaliar o efeito do meio final de aplicação na textura de esferas de alginato (no caso de interesse um meio ácido, o qual corresponde ao meio de aplicação pretendido pelo cliente final destes materiais), aquando da preparação das esferas fez-se uma aplicação de cada versão de esferas, 5 % (m/m), numa solução de ácido cítrico monoidratado com pH entre 3,2 e 3,6.

Nesta etapa, a pasteurização das diferentes versões de preparado foi realizada a 90 °C durante 3 minutos e a gelificação por difusão foi efetuada com o preparado a uma temperatura de 75±10 °C, a uma distância da solução de cloreto de cálcio de 30 cm. Para a execução do processo de gelificação por difusão utilizou-se um suporte metálico ajustável em altura, existente na Frulact, no qual é possível instalar um recipiente cilíndrico com pontas metálicas na extremidade, no qual se coloca o preparado que vai pingar na solução de cloreto de cálcio. Após a queda das últimas gotas na solução de cloreto de cálcio as esferas foram deixadas em repouso durante 3 minutos, e posteriormente foram lavadas com água corrente para libertar os resíduos de cloreto de cálcio que ainda pudessem permanecer nas esferas.

Na segunda etapa avaliou-se a influência da concentração de alginato nos mesmos níveis analisados na primeira etapa e da temperatura do preparado fazendo variar este fator em quatro níveis, nomeadamente entre 60 e 90 °C. Definiu-se a concentração das soluções de cloreto de cálcio utilizadas em 2,38 % (m/m), tendo em consideração os resultados obtidos na etapa anterior, e a pasteurização e a restante preparação das esferas foram efetuadas como antes descrito.

Para avaliar a influência do tipo de alginato na produção de esferas de alginato, na terceira etapa do trabalho produziram-se esferas utilizando como base a formulação apresentada na Tabela 3 mas utilizando seis tipos diferentes de alginatos, dois já atualmente utilizados pela Frulact na produção (Alg_001 e Alg_002) e quatro amostras de fornecedores, referidos ao longo do trabalho pelos seguintes códigos: Am_001 a Am_004. Nas fichas técnicas é possível visualizar algumas diferenças nas características dos alginatos mas não é disponibilizada qualquer informação acerca da proporção e/ou conteúdo do alginato em monómeros de ácido gulurónico e manurónico, informação que poderia ser bastante útil para o utilizador para a escolha do alginato dependendo da aplicação pretendida.

A concentração de alginato e de cloreto de cálcio definidas para utilizar em todas as versões foram 0,95 e 2,38 % (m/m), respetivamente. A pasteurização das diferentes versões de preparado foi também realizada a 90 °C durante 3 minutos e a gelificação por difusão foi efetuada com o preparado a uma temperatura de 75±10 °C; as restantes condições foram iguais às anteriormente descritas.

De forma a avaliar a influência do tratamento térmico na produção de esferas de alginato, na quarta etapa do trabalho fez-se variar em quatro níveis a temperatura de pasteurização, nomeadamente entre 85 e 100 °C, e o tempo de pasteurização em três níveis, entre 3 e 9 minutos. A concentração de alginato e de cloreto de cálcio definidas para utilizar em todas as versões foram 0,95 e 2,38 % (m/m), respetivamente, e a pasteurização das diferentes versões de preparado foi realizada à temperatura e tempo pretendidos, procedendo-se depois à gelificação por difusão como já descrito.

Incluídas nesta quarta etapa realizaram-se experiências adicionais em que se manteve o tempo de pasteurização definido em 6 minutos e variou-se a temperatura de pasteurização em quatro níveis, tendo-se neste caso avaliado a viscosidade do preparado em todas situações estudadas à mesma temperatura, nomeadamente 70 °C. Repetiu-se o mesmo esquema de experiências mas utilizando na formulação supracitada na Tabela 3 um outro tipo de amido, especificamente um amido modificado de milho.

O objetivo da quinta etapa do trabalho consistiu em caracterizar três amostras de esferas de alginato já produzidas pela Frulact industrialmente, referidas ao longo do trabalho pela sua cor final nomeadamente amarelas, verdes e vermelhas. Basicamente distinguem-se pelo corante utilizado na formulação apresentada na Tabela 4, nomeadamente betacaroteno 1%, complexo cúprico clorofila microencapsulado ou corante carmim microencapsulado, respetivamente. Na produção industrial destas esferas a temperatura de gelificação do preparado foi definida no intervalo 65±5 °C e, no início da operação, a temperatura da tremonha definida foi 86 °C e da solução de cloreto de cálcio foi 22 °C.

As diferentes versões de esferas de alginato obtidas em cada etapa do trabalho foram identificadas e acondicionadas em ambiente de refrigeração a uma temperatura média de 4 °C durante 48 h. Após estabilização à temperatura ambiente realizou-se a caracterização das esferas utilizando os métodos físico-químicos descritos no ponto 3.2 deste trabalho.

Tabela 4. Formulação de produto acabado.

Descrição matéria - prima	% (m/m)
XAROPE GLUCOSE FRUTOSE	28,50
AÇÚCAR	25,00
ÁGUA QUENTE (ENTRE 80 °C E 90 °C)	20,00
ÁGUA FRIA	14,44
CONC. SUMO MAÇÃ CL 70 BX (X6,25)	8,53
CORANTE BETA-CAROTENO 1% (E160A)	0,56
AMIDO MODIFICADO MILHO (E1442)	1,90
ALGINATO PROTANAL LF 20/40	1,05
MIX VITAMINAS (B6+B12) (EX)	0,02

3.1.2. Desenvolvimento de novos produtos

O desenvolvimento de novos produtos nas economias de mercados dinâmicos é um fator essencial para a sobrevivência das empresas. Isto é essencialmente verdadeiro para as empresas da indústria alimentar, na qual se inclui obviamente a Frulact, S.A., que com frequência precisa lançar produtos novos para se manter à frente da concorrência, cada vez mais cerrada.

No âmbito de um projeto de desenvolvimento interno da Frulact e após uma sessão de *brainstorming* com as equipas de inovação, investigação e desenvolvimento surgiu a hipótese de durante a segunda fase deste trabalho desenvolver esferas de alginato de queijo para aplicação final em produtos cárneos.

Neste sentido e uma vez que o queijo é um produto que na sua constituição já possui cálcio, iniciou-se as experiências utilizando o método de esferificação inversa que, como o próprio nome indica, consiste na inversão dos componentes do processo de gelificação por difusão, ou seja, inserir um produto que já contenha cálcio num banho alginato.

Para testar na primeira etapa do trabalho os queijos escolhidos foram queijo fresco continente, queijo fundido “A vaca que ri”, queijo creme “A vaca que ri”, queijo creme tipo flamengo “Continente” e queijo bola flamengo. Começou-se por preparar soluções de alginato de sódio com concentrações de 0,35, 0,5, 0,75 e 1 % (m/m) sendo posteriormente acondicionadas no frigorífico durante 24 h. Após esse período de tempo, formularam-se preparados dos diferentes queijos com concentrações variáveis entre 5, 20 e 30 % (m/m) e procedeu-se ao processo de esferificação inversa de todos os preparados. Como em

nenhum dos casos testados se formaram esferas e se verificou que a quantidade de cálcio presente na constituição do queijo era provavelmente insuficiente para reagir com o alginato presente em solução, decidiu-se nas etapas posteriores utilizar o processo de esferificação normal, ou seja, o processo de gelificação por difusão.

Deste modo, selecionou-se para a segunda etapa do trabalho o queijo fundido “A vaca que ri” e o queijo creme flamengo “Continente” e estabeleceram-se as formulações apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Formulações iniciais estabelecidas para a produção de esferas de alginato pelo método de gelificação por difusão.

Mat. Prima	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
	% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)
Água	92,0	90,0	84,0	64,0	46,0	26,0	6,0	82,0
Sal	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Queijo	5,0	5,0	10,0	30,0	50,0	70,0	90,0	10,0
Alginato	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0
Açúcar	1,5	3,0	3,0	3,0	1,5	1,5	1,5	3,0
Amido								2,0

As soluções de cloreto de cálcio sobre as quais se procedeu à gelificação por difusão tinham uma concentração definida de 3 % (m/m), e a distância a que decorreu o processo foi 30 cm.

Na terceira etapa do trabalho, e tomando como base uma formulação com 30 % (m/m) queijo, 1 % (m/m) alginato e sem amido adicionado, testaram-se diferentes amostras de aromas de queijo e posteriormente corantes, mas neste caso utilizando já as aromatizações escolhidas. Para tal prepararam-se 1000 g de preparado e dividiu-se em 10 porções, para se poder comparar o preparado sem aroma, o preparado com a dosificação média de cada aroma e um preparado dosificado com uma diluição 1:10 de um aroma selecionado, para se perceber se haveria a necessidade de diluir os aromas. Posteriormente, as diferentes amostras foram provadas por vários colaboradores da Frulact de modo a que estes escolhessem 2/3 dos preparados que os fizessem lembrar uma “tosta mista”.

Na quarta etapa do trabalho decidiu-se experimentar produzir esferas de alginato com aroma a queijo, mas que efetivamente não contivessem queijo na formulação. Testaram-se três formulações e a junção de dois corantes, o dióxido de titânio e o betacaroteno para tentar obter esferas com uma cor idêntica à do queijo.

Após as primeiras etapas do trabalho decidiu-se testar três produtos com formulações distintas nomeadamente esferas sem queijo, esferas com 30 % (m/m) queijo e esferas com 50 % (m/m) queijo na aplicação inicialmente pretendida, peças de fiambre de peru e perna extra.

Na quinta etapa do trabalho testaram-se formulações com 15 % (m/m) queijo e com a incorporação de diferentes concentrações de um amido considerado mais resistente à temperatura, nomeadamente amido modificado de milho, de dosagens superiores de aroma e de conservantes. As esferas produzidas foram conservadas em diferentes condições, ou seja, à temperatura ambiente, à temperatura de refrigeração e numa calda acidificada com ácido láctico. Algumas amostras foram ainda selecionadas para serem analisadas a nível microbiológico após uma e três semanas de armazenamento nas condições referidas.

3.2. Análises físico-químicas

3.2.1. Viscosidade

A viscosidade é a medida da resistência ou fricção interna de uma substância ao fluxo quando submetida a uma tensão. Quanto mais viscosa a massa, mais difícil de escoar e maior o seu coeficiente de viscosidade¹⁸.

Neste trabalho a determinação da viscosidade da solução de alginato original (preparado) foi efetuada com um viscosímetro rotacional Brookfield DV – II + Pro, versão RV. Este equipamento mede a viscosidade do fluido a determinadas taxas de corte. No caso em estudo as medições da viscosidade das amostras efetuaram-se, em triplicado, durante 1 minuto, a 20 rotações por minuto (RPM) utilizando a *spindle* número 05. A escolha da *spindle* foi efetuada com base nas regras indicadas no livro de instruções do equipamento, tendo em consideração que uma seleção apropriada resulta em medições realizadas entre 10-100 na escala 100 % torque do instrumento, não sendo recomendadas leituras abaixo dos 10 %.

3.2.2. Teor em sólidos solúveis

O índice de refração é uma propriedade importante de sólidos, líquidos e gases. A medida do índice de refração pode ser usada para determinar a concentração de uma solução pois o funcionamento dos refratómetros baseia-se no princípio que o índice de

refração dos sólidos dissolvidos em soluções é proporcional à sua concentração. Por isso a refratometria na escala °Brix constitui um método físico para medir a quantidade de sólidos solúveis presentes numa amostra, que corresponde ao total de todos os compostos dissolvidos em água nomeadamente açúcares, sal, proteínas, ácidos, entre outros.

As medições do teor em sólidos solúveis da solução de alginato original (preparado) neste trabalho foram efetuadas utilizando um refratômetro de marca RFM732, B⁺S (Bellingham+Stanley Ltd).

3.2.3. pH

Neste trabalho a determinação do pH da solução de alginato original (preparado) foi efetuada usando um medidor de pH acoplado a um eletrodo de pH. O medidor de pH é um milivoltímetro com uma escala que converte o valor de tensão do eletrodo em unidades de pH, sendo este tipo de eletrodo denominado “ião seletivo”.

O equipamento utilizado neste trabalho para a medição de pH foi um analisador multi parâmetros da marca Consort C860 e respetivas soluções tampão de pH (pH 7,0 e 4,0).

3.2.4. Condutividade

A condutividade elétrica é uma medida da capacidade de uma solução aquosa conduzir uma corrente elétrica devido à presença de iões. Essa propriedade varia com a concentração de substâncias ionizadas dissolvidas na água, com a temperatura, com a mobilidade dos iões, com a valência dos iões e com as concentrações real e relativa de cada ião.

A determinação da condutividade é realizada pelo método condutivimétrico, que se baseia na medição da resistência da amostra e é dado em condutância específica (condutividade elétrica a 20 ou 25°C). O procedimento de medição da condutividade elétrica depende da marca e do modelo do condutivímetro utilizado.

O equipamento utilizado neste trabalho para a medição da condutividade da solução de cloreto de cálcio foi um analisador multi parâmetros da marca Consort C860 e a respetiva solução padrão 0,01M KCl.

3.2.5. Massa

Para a determinação da massa das esferas pesaram-se cinco réplicas de conjuntos de dez esferas numa balança analítica da marca Kern & Sohn GmbH.

3.2.6. Textura

A percepção da textura dos alimentos é essencialmente uma experiência humana resultante da interação com os alimentos, a sua estrutura e comportamento quando manuseados e sem dúvida desempenha um papel chave na nossa apreciação dos alimentos. A nossa percepção da textura dos alimentos constitui frequentemente um critério através do qual julgamos a sua qualidade e é habitualmente um fator importante para selecionarmos ou rejeitarmos um alimento.

Na norma ISO11036 define-se textura como sendo “todos os atributos mecânicos, geométricos e superficiais de um produto perceptíveis por meio de recetores mecânicos, tácteis e, onde apropriado, visuais e auditivos”²⁵. Os atributos mecânicos estão relacionados com a reação do produto à tensão, os atributos geométricos estão relacionados com o tamanho, forma e arranjo das partículas no produto e, finalmente, os atributos superficiais relacionados com as sensações produzidas na boca pelo teor de água e/ou gordura.

Neste trabalho foram avaliados em detalhe os parâmetros associados à textura das esferas definidos na Tabela 6, utilizando-se um texturómetro TA. XTplus (*Stable Micro Systems*) e o software *Exponent* acoplado.

Realizaram-se ensaios de compressão de uma camada de esferas com o objetivo de se medir a força necessária para provocar determinada deformação e também ensaios para analisar o perfil de textura das esferas – *Texture Profile Analysis* (TPA). Este último é um método objetivo para avaliar propriedades sensoriais, uma vez que no caso em estudo mimifica a mastigação de um volume de esferas, sendo que o procedimento implica a compressão da amostra de alimento duas vezes sucessivas até uma percentagem de deformação previamente definida¹⁸.

Tabela 6. Definições e métodos para avaliar os atributos de textura (adaptada de ISO11036²⁵).

Característica	Definição sensorial	Técnica
Parâmetros primários		
<i>Firmeza</i>	Atributo mecânico de textura relacionado com a força requerida para alcançar uma determinada deformação ou penetração de um produto. Na boca, é percebida pela compressão do produto entre os dentes (sólidos) ou entre a língua e o palato (semisólidos).	Colocar a amostra entre os dentes molares ou entre a língua e o palato e mastigar uniformemente, avaliando a força requerida para comprimir o alimento.
<i>Coesividade</i>	Atributo mecânico de textura relacionado com o grau em que uma substância pode ser deformada antes de quebrar. Inclui as propriedades de fracturabilidade, mastigabilidade e gomosidade.	Colocar a amostra entre os dentes molares, comprimi-la e avaliar a quantidade de deformação antes da rutura.
<i>Elasticidade</i>	Atributo mecânico de textura relacionado com a rapidez de recuperação de uma força de deformação, e com o grau ao qual o material deformado retorna à sua condição não deformada após a remoção da força de deformação.	Colocar a amostra entre a língua e o palato (se for um semissólido) ou os dentes molares (se for um sólido) e comprimi-la parcialmente; remover a força e avaliar o grau e rapidez de recuperação.
<i>Adesividade</i>	Atributo mecânico de textura relacionado com a força requerida para remover o material que adere à boca ou a um substrato.	Colocar a amostra na língua, pressioná-la contra o palato, e avaliar a força necessária para removê-la com a língua.
Parâmetros secundários		
<i>Fraturabilidade (fragilidade)</i>	Atributo mecânico de textura relacionado com a coesividade e com a força necessária para quebrar um produto em migalhas ou pedaços.	Colocar a amostra entre os dentes molares e morder uniformemente até que a amostra se esmigalhe, rache ou quebre, avaliando a força com que o alimento se afasta dos dentes.
<i>Mastigabilidade</i>	Atributo mecânico de textura relacionado com a coesividade e com o período de tempo ou o número de mastigações requeridas para mastigar um produto sólido até um estado pronto para engolir.	Colocar uma amostra na boca e manipular a uma mordidela por segundo a uma força igual à requerida para penetrar uma gota de goma em ½ segundo, e avaliar a energia ou o número de mastigações requeridas para reduzir a amostra até um estado pronto para engolir.
<i>Gomosidade</i>	Atributo mecânico de textura relacionado com a coesividade de um produto mole. Na boca, está relacionado com o esforço requerido para desintegrar o produto a um estado pronto para engolir.	Colocar uma amostra na boca e manipulá-la com a língua contra o palato, avaliando a quantidade de manipulação necessária antes do produto se desintegrar.

Um perfil geral da textura de um gel e os parâmetros calculados a partir deste são indicados na Figura 12.

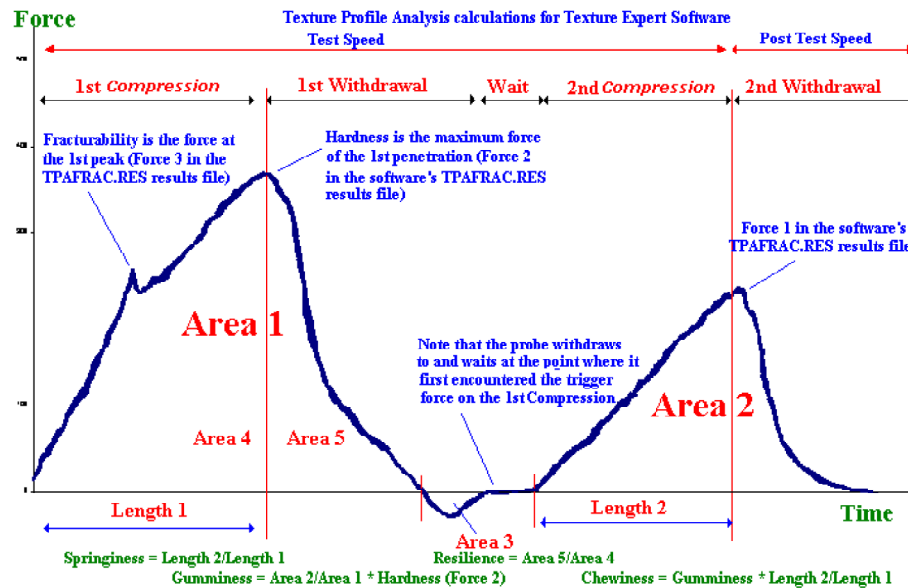


Figura 12. Perfil típico de textura de um gel²⁶.

A descrição mais detalhada dos métodos utilizados na análise da textura das esferas de alginato é apresentada de seguida.

3.2.6.1. Método 1 – Compressão

O método de análise dos parâmetros de textura – firmeza e adesividade – consistiu em pesar 5 g de esferas, colocá-las no suporte do texturómetro e proceder ao ensaio, utilizando uma célula de carga de 50 kg e como sonda uma placa de compressão de 200 mm de diâmetro. A distância de compressão foi de 2,5 mm o que induz nas esferas uma compressão na gama de 40-60 % dependendo da dimensão das mesmas. Analisaram-se 10 réplicas de cada amostra.

3.2.6.2. Método 2 – *Texture Profile Analysis* (TPA)

O método de análise dos parâmetros de textura – fraturabilidade, elasticidade, coesividade, entre outros – consistiu em utilizar a sonda *Back Extrusion*, com um disco de compressão de 45 mm e, novamente a célula de carga de 50 kg, colocando no copo com um diâmetro interno de 50 mm, um volume de esferas correspondente a uma altura de 2

cm, colocá-lo no suporte do texturómetro e proceder ao ensaio TPA, com uma distância de compressão de 1 cm e tempo entre compressões sucessivas de 2 s, o que induz uma compressão de 50 % do volume das esferas. Analisaram-se 10 réplicas de cada amostra.

3.2.7. Esfericidade

Para a determinação da dimensão e do valor de esfericidade das esferas, tiraram-se 10 fotografias, em posição ortogonal, de conjuntos de 5 esferas, em cada ensaio. Para tal, utilizou-se uma superfície plana e branca onde se colocaram as esferas e como referência de escala, uma régua. Um software de tratamento de imagem (GIMP2) foi posteriormente utilizado para fazer a relação entre pixéis (unidades da fotografia) e milímetros.

Os valores de esfericidade foram posteriormente calculados tendo em consideração a seguinte relação:

$$Esfericidade = \frac{D_{m\acute{a}x}}{D_{m\acute{i}n}} \quad (1)$$

É de salientar que para se considerar uma gota perfeitamente esférica o valor de esfericidade deve ser igual a 1.

3.2.8. Análises microbiológicas

Um primeiro aspeto importante a salientar neste momento é que as análises microbiológicas que se referem neste trabalho apenas foram realizadas na fase de desenvolvimento de novos produtos, nomeadamente, às esferas de queijo.

Analisar, de forma qualitativa, a evolução da flora microbiológica das esferas de queijo ao longo do tempo tornou-se bastante importante neste trabalho uma vez que se prevê que este produto tenha, no mínimo, um período de armazenamento entre três semanas a um mês, antes serem aplicadas no produto final.

De uma forma geral os alimentos são um meio de cultura ideal para o desenvolvimento de diversos microrganismos pois os seus componentes constituem uma fonte de carbono e/ou energia para o crescimento microbiano, permitindo a proliferação dos microrganismos presentes. Este processo provoca alterações do próprio alimento, nomeadamente o aparecimento de sabores desagradáveis devido à degradação ou síntese de novos compostos. O alimento assim alterado considera-se degradado ou deteriorado,

frequentemente impróprio para consumo humano. Por este motivo e consoante a categoria dos alimentos deve-se tentar prever os tipos de microrganismos que se podem encontrar nos alimentos. Neste trabalho em específico, para ter uma ideia genérica da contaminação microbiológica nas esferas de queijo analisou-se a evolução dos microrganismos a 30 °C, também denominados de bactérias mesófilas, e dos bolores e leveduras porque estes tipos de microrganismos têm probabilidade de se desenvolverem em leite e produtos lácteos, como é o caso do queijo, e a sua análise permite ter uma ideia geral da carga microbiológica que pode estar presente nos alimentos.

As amostras de esferas de queijo analisadas tinham uma semana de armazenamento em condições distintas, nomeadamente à temperatura ambiente, temperatura de refrigeração e aplicadas numa calda ácida. Após obtenção destes resultados foram selecionadas as amostras que na primeira semana não apresentavam contaminação para serem analisadas após três semanas de armazenamento.

3.2.8.1. Microrganismos a 30 °C

Os microrganismos a 30 °C, também denominados frequentemente de mesófilos, desenvolvem-se principalmente na gama de temperaturas entre 10 e 50 °C, sendo a temperatura ótima de desenvolvimento 37 °C e são a quase totalidade dos microrganismos patogénicos para o homem e animais de sangue quente e a maioria das estirpes com interesse em microbiologia alimentar²⁷. Deste modo a análise da evolução deste tipo de microrganismos fornece uma indicação geral, mas muito útil, sobre a carga microbiológica dos alimentos. Este tipo de microrganismos pode estar envolvido na contaminação e na degradação de diversos alimentos tais como pão, fruta, laticínios, carnes, entre outros.

Segundo a norma ISO 4833 este grupo de microrganismos define-se como sendo todas as bactérias aeróbias, leveduras e bolores com a capacidade de formar colónias em meio nutritivo sólido, após incubação em aerobiose a 30 °C, nas condições descritas no método²⁸.

Neste trabalho pretendeu-se apenas avaliar qualitativamente a evolução deste tipo de microrganismos e não a contagem rigorosa das colónias formadas, no entanto o método utilizado baseou-se no descrito na norma ISO 4833 cujo princípio consiste em preparar duas placas usando um meio de cultura específico e uma quantidade específica da amostra que se pretende analisar, se o produto inicial é líquido, ou usando uma quantidade

específica de uma suspensão inicial no caso de outros produtos. Outros pares de placas são preparados, nas mesmas condições, usando diluições decimais da amostra teste ou da suspensão inicial, sendo posteriormente incubadas aerobicamente a 30 °C durante 72 h. Após este período de tempo faz-se o cálculo do número de microrganismos a partir do número de colônias obtidas nas placas selecionadas²⁸ (esta última parte não foi realizada neste trabalho).

O meio utilizado neste trabalho foi o *Plate Count Agar* (PCA) da marca *Merck KGaA*, que isola os microrganismos com o objetivo de os enumerar, não sendo no entanto um meio seletivo. Para a preparação deste meio seguiram-se as instruções descritas no rótulo, nomeadamente dissolveram-se 22,5 g do produto sólido num litro de água destilada quente e esterilizou-se na autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Para proceder à inoculação das amostras de esferas de queijo começou-se por preparar as diluições das mesmas, importando salientar que todo o procedimento infra descrito foi realizado no interior de uma câmara de fluxo laminar. Uma vez que era necessário garantir um volume adequado de solução para se conseguir triturar as esferas com uma varinha mágica, pesou-se 1 g de esferas e diluiu-se em 19 mL de solução de água peptonada tamponada (preparada segundo as instruções do rótulo, ou seja suspendeu-se 20 g de produto sólido marca *Liofilchem* num litro de água destilada, aqueceu-se até completa dissolução e esterilizou-se na autoclave a 121 °C durante 15 minutos) obtendo-se assim diretamente a diluição 10^{-2} . Desta diluição transferiu-se com uma pipeta estéril 1 ml de suspensão para duas placas de Petri estéreis e 1 ml para obter a diluição 10^{-3} e a partir desta diluição repetiu-se o procedimento de transferência de 1 ml para outras duas placas de Petri estéreis. Como o objetivo neste trabalho era apenas uma análise qualitativa da evolução dos microrganismos e não a sua contagem rigorosa não se continuou o procedimento de diluições sucessivas.

Posteriormente verteu-se cerca de 12 – 15 ml de meio PCA entre 44 e 47 °C em cada uma das placas de Petri e cuidadosamente misturou-se o inóculo com o meio girando as placas e deixou-se a mistura solidificar deixando as placas em repouso na superfície fria da câmara de fluxo laminar. Após completa solidificação inverteu-se as placas e colocou-se na estufa a incubar a 30 °C durante 72 ± 3 h.

3.2.8.2. Bolores e Leveduras

Os bolores e leveduras são considerados contaminantes muito importantes dos alimentos por tolerarem valores de pH e atividade água (a_w) baixos e também porque determinadas espécies são produtoras de micotoxinas.

Os bolores são fungos filamentosos, multicelulares, mesófilos com temperatura ótima de crescimento entre 25 – 30 °C e aeróbios, desenvolvendo-se na superfície dos alimentos ou onde haja presença de ar. Podem apresentar colônias com diversas colorações, com aspecto de algodão devido à presença de um aglomerado de hifas que forma um micélio. Obtêm a sua alimentação da matéria orgânica em decomposição ou nutrem-se como parasitas de hospedeiros. Alguns são benéficos ao homem auxiliando na indústria alimentar (ex. maturação de queijos) e na indústria farmacêutica (ex. produção de penicilina).

As leveduras são organismos mesófilos com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30 °C, havendo espécies aeróbias estritas e espécies facultativas, podendo estas últimas provocar a fermentação alcoólica dos alimentos. Podem apresentar colônias com diversas colorações e, como células simples que são, crescem e reproduzem-se mais rapidamente que os bolores pois são mais eficientes na realização de reações químicas, devido à sua maior relação área/volume.

Ambos os microrganismos anteriormente mencionados multiplicam-se numa ampla faixa de pH entre 2,0 e 8,5. Desta forma são os principais deteriorantes de alimentos com pH inferior a 4,0 – 4,5, nos quais se multiplicam com facilidade²⁹.

A presença de fungos filamentosos e leveduras viáveis num índice elevado nos alimentos pode fornecer várias informações tais como condições higiénicas deficientes de equipamentos, multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e/ou armazenamento e matéria-prima com contaminação excessiva.

O método utilizado para a análise qualitativa da evolução de bolores e leveduras nas esferas de queijo foi em tudo semelhante ao descrito anteriormente para a análise dos microrganismos a 30 °C exceto em dois aspetos, nomeadamente no meio utilizado, que neste caso foi o *Yeast Glucose Chloramphenicol Agar* (YGC) da marca *Liofilchem* preparado a partir das instruções do rótulo (dissolveu-se 43,1 g do produto sólido num litro de água destilada e aqueceu-se até completa dissolução, esterilizando-se posteriormente na autoclave a 121 °C durante 15 minutos) recomendado para este tipo de análise em carnes e

produtos derivados de carnes, peixes, mariscos, leite e produtos láteos, e a incubação foi realizada a 25 °C durante 5 dias.

3.3. Análise estatística

As experiências foram conduzidas em blocos completamente casualizados com 5 réplicas (n) para a massa, $n = 10$ para os parâmetros de textura (firmeza, adesividade, entre outros) e $n = 50$ para a esfericidade. Os dados foram sujeitos a uma análise de variância unifatorial, com o objetivo de testar a igualdade de duas ou mais (k) médias populacionais, utilizando o software estatístico SPSS 19.0 para o Windows (SPSS, Chicago, EUA).

Para avaliar a influência da concentração de alginato e da concentração de cloreto de cálcio na produção de esferas definiu-se e fixou-se como variáveis independentes (ou fatores) a concentração de alginato e a concentração de cloreto de cálcio e como variáveis dependentes os parâmetros de caracterização das esferas, acima mencionados. No caso da avaliação da influência da concentração de alginato e da temperatura do preparado estes foram os fatores fixados e as variáveis dependentes definidas foram os parâmetros de caracterização das esferas. Para a avaliação da influência do tipo de alginato, definiu-se como fator fixo o tipo de alginato e como variáveis dependentes os parâmetros de caracterização das esferas. No que se refere à avaliação da influência do tratamento térmico, os fatores fixados foram a temperatura e o tempo de pasteurização e nos ensaios adicionais efetuados nesta etapa o tipo de amido e as variáveis dependentes definidas foram os parâmetros de caracterização das esferas. Na etapa de caracterização das amostras produzidas industrialmente pela Frulact fixou-se as versões e as variáveis dependentes definidas foram os parâmetros de caracterização das esferas.

Quando se observaram interações significativas entre os fatores fixos, efetuou-se a separação de médias separadamente dentro de cada fator utilizando o teste de Duncan com um nível de significância $\alpha = 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Gelificação por difusão – Estudo do efeito das variáveis do processo

4.1.1. Concentração de alginato versus concentração de cloreto de cálcio

Os objetivos do trabalho na primeira etapa foram avaliar a influência da concentração de alginato e da concentração de cloreto de cálcio na produção e nas características das esferas de alginato e avaliar o efeito da aplicação das esferas numa solução ácida cujo pH imitasse o da aplicação final para o cliente.

De seguida são apresentados os resultados que permitem caracterizar a solução de alginato original (preparado) bem como as esferas de alginato produzidas em cada um dos ensaios.

4.1.1.1. Caracterização da solução de alginato original

Em cada ensaio, correspondente a uma concentração de alginato distinta avaliaram-se diferentes parâmetros nomeadamente o teor em sólidos solúveis, o pH e a viscosidade do preparado ($n = 1$). Além disso, avaliou-se o tempo que durou a operação de gelificação por difusão de 3 litros de preparado, em cada ensaio. Os resultados obtidos para cada um dos parâmetros anteriormente mencionados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros avaliados durante a preparação das diferentes versões de preparado.

[Alg] (%) (m/m)	TSS (° Brix)	pH	Viscosidade (cP)	Duração operação (min)
0,40	61,1	---*	348	40
0,68	60,0	4,56	956	50
0,95	58,9	4,84	1924	60
1,23	56,5	4,86	3220	120
1,50	62,9	4,56	3720	200

* Este parâmetro não foi avaliado devido à ocorrência de uma falha elétrica e consequentemente os potenciômetros foram desligados para evitar avarias.

Pela análise da Tabela 7 verifica-se que aumentando a concentração de alginato a viscosidade do preparado também aumenta bem como aumenta consideravelmente o tempo que demora a operação de gelificação por difusão. Estes resultados permitem, principalmente, tirar conclusões relativamente à exequibilidade da operação de gelificação por difusão quando se pretender passar da escala laboratorial para a de produção.

4.1.1.2. Caraterização das esferas de alginato

Na primeira etapa do trabalho as esferas produzidas em cada ensaio foram caraterizadas através da sua massa, firmeza, adesividade e esfericidade. As esferas que foram aplicadas, na proporção de 5 % durante 48 h, na solução de ácido cítrico monoidratado com pH entre 3,2 e 3,6 foram caraterizadas relativamente à sua firmeza e adesividade. Os resultados obtidos referentes a estes parâmetros bem como a análise estatística efetuada a cada um deles encontram-se apresentados na Tabela 8.

Pela análise da Tabela 8 verifica-se que os *p-value* obtidos são todos inferiores ao nível de significância $\alpha = 0,05$ definido, indicando assim que há diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de cada fator comparados, bem como há interação significativa entre os fatores fixos, nomeadamente entre a concentração de alginato e a concentração de cloreto de cálcio.

No que se refere à concentração de alginato e à sua contribuição individual para as características das esferas verifica-se que, comparando os preparados com diferentes níveis de concentração de alginato aqueles que tiverem uma concentração mais elevada deste composto dão origem a esferas com massa, firmeza e esfericidade superiores e adesividade inferior. Relativamente à concentração de cloreto de cálcio e à sua contribuição individual para as características das esferas verifica-se que, concentrações mais elevadas dão origem a esferas mais firmes mas menos esféricas que concentrações baixas de cloreto de cálcio que dão origem a esferas com massa superior e adesividade inferior.

Uma vez que se observaram interações significativas entre os fatores fixos, nomeadamente concentração de alginato e concentração de cloreto de cálcio, efetuou-se a separação/comparação de médias separadamente dentro de cada fator, para cada parâmetro, fixando-se a concentração de alginato e variando-se a concentração de cloreto de cálcio, utilizando o teste de Duncan a $\alpha = 0,05$.

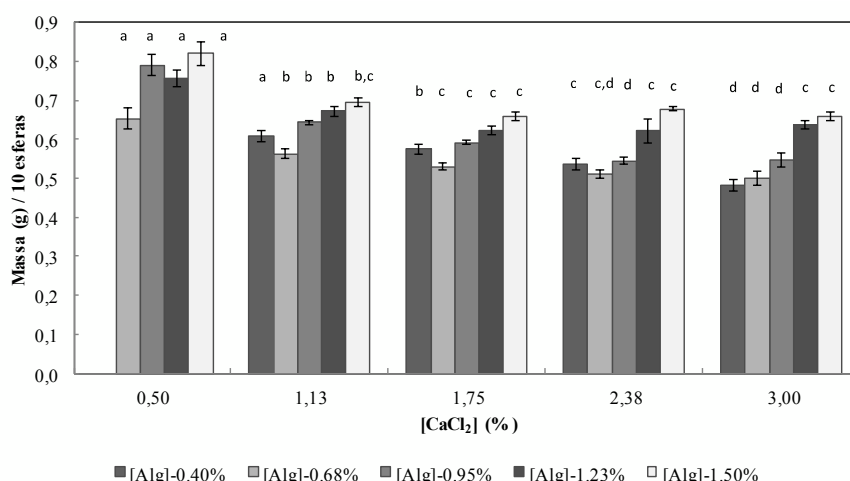
O resultado desta análise para a caraterização das esferas relativamente à massa apresenta-se na Figura 13.

Tabela 8. Caracterização das esferas produzidas e análise estatística dos parâmetros avaliados.

Fatores	Níveis	Parâmetros Avaliados					
		Massa (g)	Firmeza (N)	Adesividade (N)	Esfericidade	Firmeza (N) (ap. sol. ácida)	Adesividade (N) (ap. sol. ácida)
Conc. Alginato	0,40	0,55±0,05 ^d	61±14 ^e	-1,98±2,61 ^b	1,13±0,12 ^b	84±11 ^d	-4,78±3,29 ^b
	0,68	0,55±0,06 ^d	73±20 ^d	-0,52±0,10 ^a	1,09±0,08 ^c	79±16 ^e	-0,58±0,13 ^a
	0,95	0,62±0,09 ^c	86±19 ^c	-0,45±0,16 ^a	1,09±0,07 ^{c,d}	87±19 ^c	-0,51±0,15 ^a
	1,23	0,66±0,05 ^b	99±24 ^b	-0,54±0,22 ^a	1,07±0,06 ^d	95±20 ^b	-0,50±0,14 ^a
	1,50	0,70±0,06 ^a	108±25 ^a	-0,50±0,15 ^a	1,17±0,16 ^a	105±22 ^a	-0,48±0,15 ^a
Conc. CaCl ₂	0,50	0,75±0,07 ^a	55±11 ^d	-0,26±0,08 ^a	1,11±0,12 ^{a,b}	60±7 ^c	-0,30±0,08 ^a
	1,13	0,64±0,05 ^b	76±23 ^c	-0,62±0,87 ^b	1,10±0,10 ^b	85±12 ^b	-1,89±3,05 ^d
	1,75	0,60±0,05 ^c	94±23 ^b	-1,47±2,31 ^c	1,09±0,07 ^b	99±15 ^a	-1,83±2,81 ^d
	2,38	0,58±0,07 ^d	101±22 ^a	-0,67±0,37 ^b	1,10±0,12 ^b	101±16 ^a	-1,22±1,38 ^c
	3,00	0,57±0,07 ^e	100±21 ^a	-0,62±0,07 ^b	1,13±0,13 ^a	101±15 ^a	-0,71±0,35 ^b
Fatores		<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
Conc. Alginato		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Conc. CaCl ₂		<0,001	<0,001	<0,001	0,005	<0,001	<0,001
Interação		<0,001	0,003	<0,001	0,022	0,002	<0,001

Legenda: a – média estatisticamente mais elevada; e – média estatisticamente mais baixa.

Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes e letras iguais significam médias estatisticamente iguais dentro do mesmo fator.



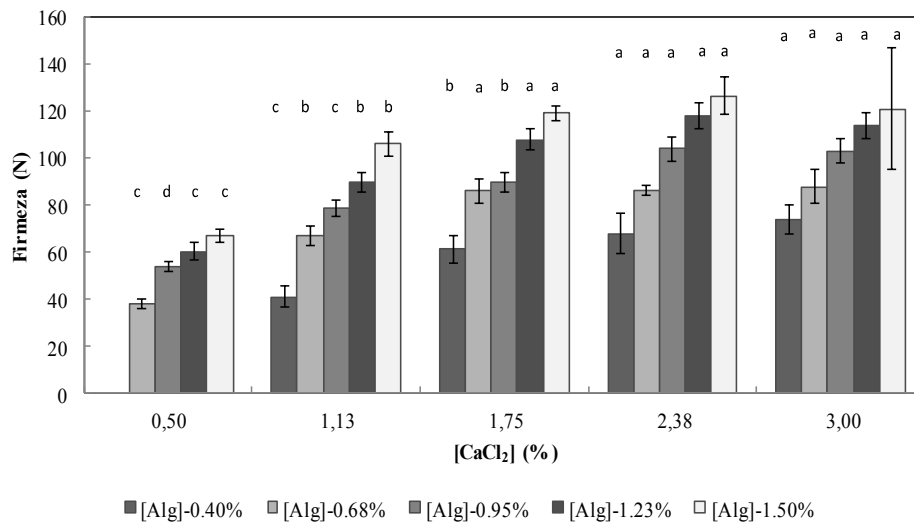
Nota: Não foi realizada a medição da massa das esferas no caso do ensaio com [Alg] – 0,40% e [CaCl₂] – 0,50% porque não se obtiveram esferas consistentes mas uma “pasta”.

Figura 13. Variação da massa das esferas com a concentração de alginato e com a concentração de cloreto de cálcio e análise estatística associada.

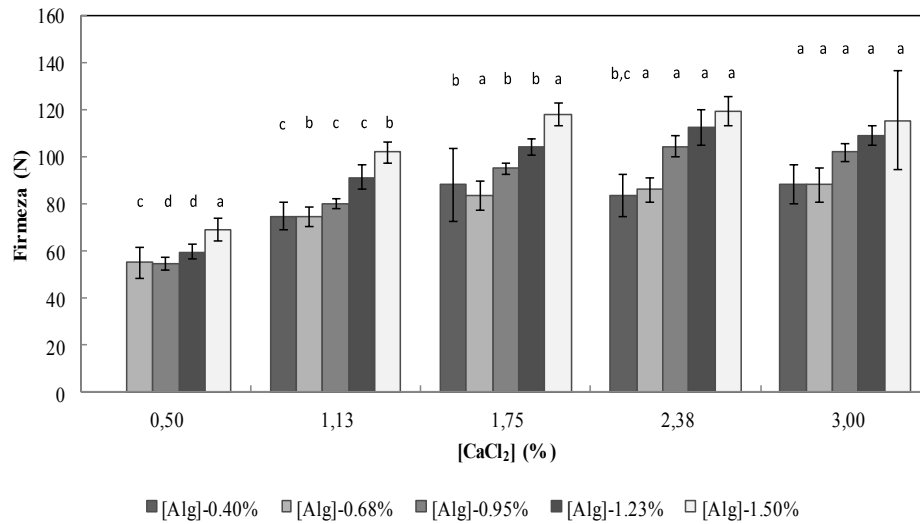
Pela análise estatística efetuada verifica-se que fixando a concentração de alginato existem diferenças altamente significativas entre as médias de massa obtidas dentro de cada nível de concentração de cloreto de cálcio, uma vez que em todos os casos se obteve $p\text{-value} < 0,001$. Além disso, verifica-se que o nível de concentração de cloreto de cálcio que origina esferas com massa superior é o mais baixo, nomeadamente 0,50 % (m/m) e posteriormente o valor da massa das esferas vai diminuindo.

No que se refere aos parâmetros de textura nomeadamente firmeza e adesividade das esferas não aplicadas e aplicadas em solução ácida os resultados obtidos apresentam-se nas Figura 14 e Figura 15.

Pela análise estatística efetuada verifica-se que fixando a concentração de alginato existem diferenças altamente significativas entre as médias de firmeza obtidas dentro de cada nível de concentração de cloreto de cálcio, nas esferas não aplicadas em solução ácida e nas esferas aplicadas em solução ácida, uma vez que em todos os casos se obteve $p\text{-value} < 0,001$. Nas duas situações estudadas verifica-se que os níveis correspondentes a concentrações mais elevadas de cloreto de cálcio originam esferas mais firmes ao inverso dos níveis correspondentes a concentrações mais baixas.



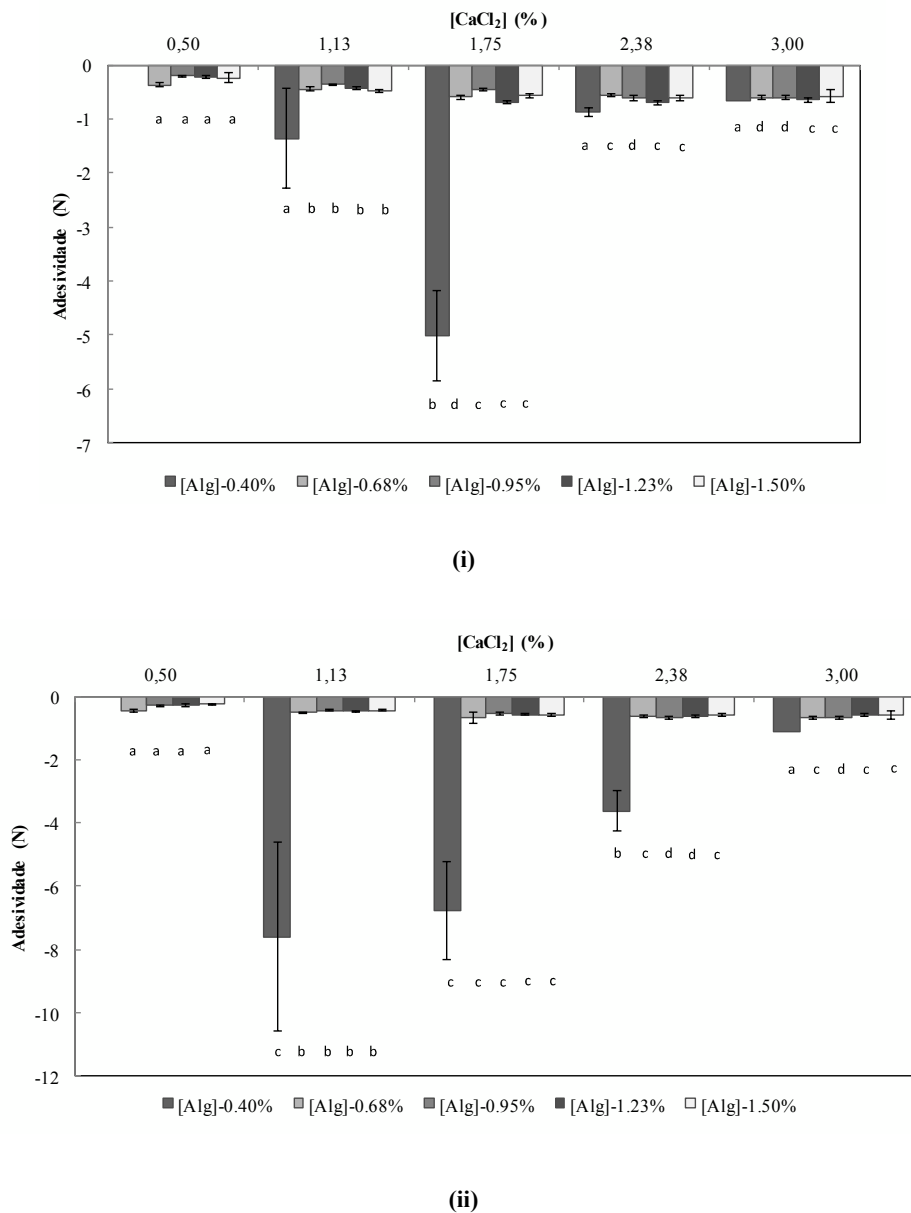
(i)



(ii)

Nota: Não foi realizada a medição da firmeza das esferas no caso do ensaio com [Alg] – 0,40% e [CaCl₂] – 0,50% porque não se obtiveram esferas consistentes mas uma “pasta”.

Figura 14. Variação da firmeza das esferas com a concentração de alginato e com a concentração de cloreto de cálcio em (i) esferas não aplicadas em solução ácida e (ii) esferas aplicadas em solução ácida e análise estatística associada.



Nota: Não foi realizada a medição da adesividade das esferas no caso do ensaio com [Alg] – 0,40% e [CaCl₂] – 0,50% porque não se obtiveram esferas consistentes mas uma “pasta”.

Figura 15. Variação da adesividade das esferas com a concentração de alginato e com a concentração de cloreto de cálcio em (i) esferas não aplicadas em solução ácida e (ii) esferas aplicadas em solução ácida e análise estatística associada.

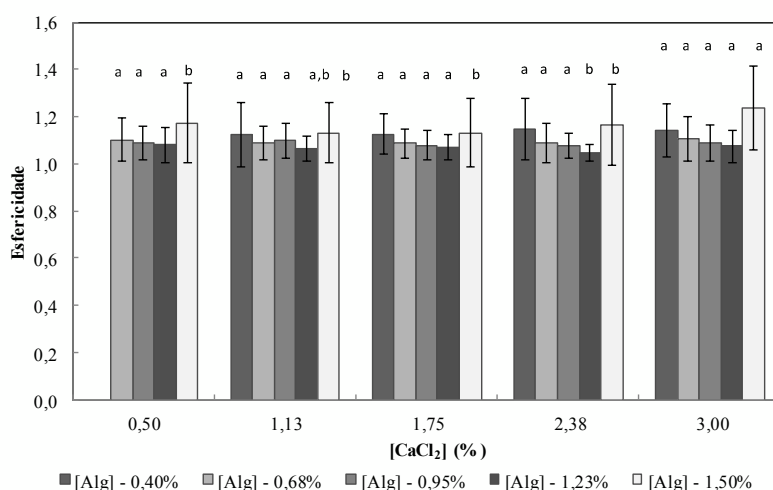
Comparando as duas situações estudadas não se observam diferenças significativas entre a firmeza das esferas conservadas em condições diferentes, nomeadamente entre as que não foram aplicadas em solução ácida e as que foram aplicadas em solução ácida.

Relativamente aos resultados da adesividade das esferas, verifica-se que fixando a concentração de alginato existem diferenças altamente significativas entre as médias obtidas dentro de cada nível de concentração de cloreto de cálcio, nas esferas não aplicadas

em solução ácida e nas esferas aplicadas em solução ácida, uma vez que em todos os casos se obteve $p\text{-value} < 0,001$. Em geral, verifica-se que a adesividade das esferas é menos elevada quando os níveis de concentração de cloreto de cálcio são baixos.

Comparando as duas situações estudadas verifica-se que os ensaios realizados com uma concentração de alginato de 0,40 % (m/m) no caso das esferas aplicadas em solução ácida apresentam valores de adesividade superiores aos obtidos no caso das esferas não aplicadas, excetuando o ensaio com a concentração de cloreto de cálcio de 1,75 % (m/m) no qual se obteve valores semelhantes em ambos os casos. Nos ensaios com concentração de alginato superior a 0,40 % (m/m) os valores de adesividade obtidos em ambos os casos são semelhantes.

Os resultados obtidos para a esfericidade das esferas formadas em cada caso são apresentados na Figura 16.



Nota: Não foi realizada a medição da esfericidade das esferas no caso do ensaio com [Alg] – 0,40% e [CaCl₂] – 0,50% porque não se obtiveram esferas consistentes mas uma “pasta”.

Figura 16. Variação da esfericidade das esferas com a concentração de alginato e com a concentração de cloreto de cálcio e análise estatística associada.

Pela análise estatística efetuada verifica-se que apenas quando a concentração de alginato é fixa em 1,50 % (m/m) é que existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias de esfericidade obtidas dentro de cada nível de concentração de cloreto de cálcio pois obteve-se $p\text{-value}$ igual a 0,006 e nas restantes situações obteve-se $p\text{-value} > 0,05$. É importante salientar ainda que em nenhum caso se obteve esferas que se possam considerar perfeitamente esféricas uma vez que os valores de esfericidade são todos superiores a 1.

4.1.2. Concentração de alginato versus temperatura do preparado

O objetivo do trabalho na segunda etapa consistia em avaliar a influência da concentração de alginato e da temperatura do preparado na produção de esferas de alginato.

De seguida são apresentados os resultados que permitem caracterizar a solução de alginato original (preparado) e a solução de cloreto de cálcio utilizada no processo de gelificação por difusão bem como as esferas de alginato produzidas em cada um dos ensaios.

4.1.2.1. Caracterização da solução de alginato original

Em cada ensaio, correspondente a uma concentração de alginato distinta, à semelhança do descrito em 4.1.1.1 avaliaram-se diferentes parâmetros incluindo o tempo que durou a operação de gelificação por difusão de 1 litro de preparado, em cada ensaio, estando os resultados obtidos apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros avaliados durante a preparação das diferentes versões de preparado.

[Alg] (%) (m/m)	TSS (° Brix)	pH	Viscosidade (cP)	Duração operação (min)
0,40	60,5	4,70	460	24
0,68	59,9	4,69	688	31
0,95	56,5	4,68	800	47
1,23	57,7	4,62	2412	77
1,50	60,2	4,60	5160	158

Pela análise da Tabela 9 verifica-se que, tal como na primeira etapa deste trabalho, aumentando a concentração de alginato a viscosidade do preparado também aumenta bem como aumenta consideravelmente o tempo que demora a operação de gelificação por difusão. A viscosidade do preparado foi ainda avaliada nas condições de temperatura pré-especificadas para cada ensaio sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 17. Como se pode observar na Figura 17 a viscosidade aumenta com a concentração de alginato e, para a mesma concentração de alginato diminui com o aumento da temperatura, como era teoricamente esperado.

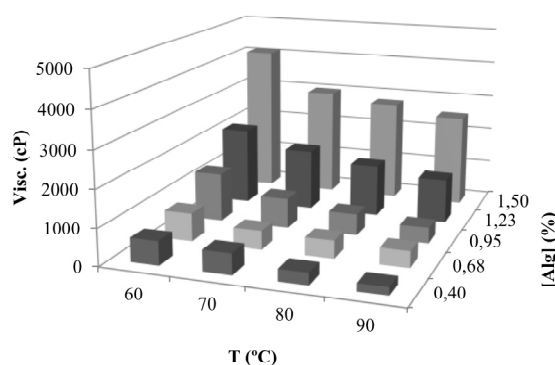


Figura 17. Variação da viscosidade da solução de alginato original (preparado) com a concentração de alginato e com a concentração de cloreto de cálcio.

4.1.2.2. Caraterização da solução de cloreto de cálcio

A condutividade da solução de cloreto de cálcio sobre a qual se procedeu ao processo de gelificação por difusão do preparado foi avaliada no início e no final da operação, encontrando-se os valores médios obtidos na Figura 18.

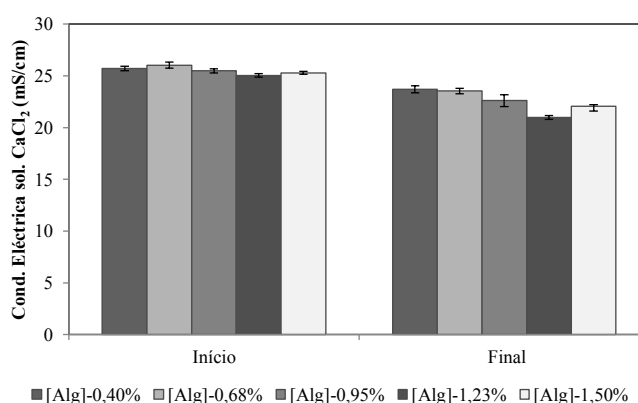


Figura 18. Variação da condutividade da solução de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de esferas de alginato, a partir de 1 L de preparado.

Como já mencionado no ponto 3.2.4 a condutividade elétrica varia com a concentração de substâncias ionizadas dissolvidas na água, e como tal era expectável que à medida que o cloreto de cálcio reage com o alginato durante a operação de gelificação, a sua concentração vá diminuindo e consequentemente a condutividade, como pode ser observado na Figura 18.

Para se compreender em termos de concentração a diferença que existe nos valores de condutividade obteve-se uma reta de calibração relacionando a condutividade e a concentração de soluções de cloreto de cálcio, representada na Figura 19.

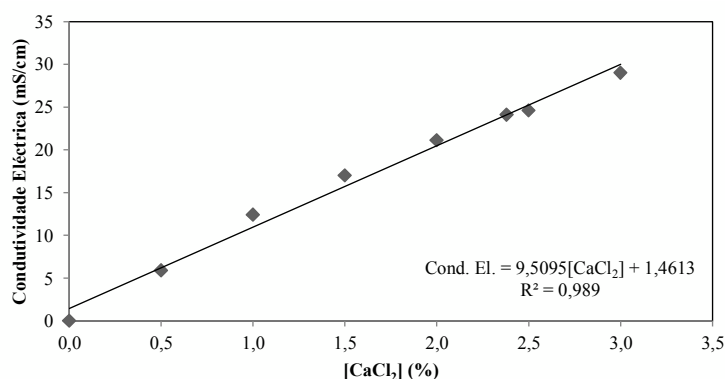


Figura 19. Reta de calibração – Relação entre a condutividade eléctrica e a concentração de cloreto de cálcio.

Com base nos valores de condutividade medidos e na reta de calibração obtida calculou-se a concentração de cloreto de cálcio respetiva e na Figura 20 apresenta-se a variação da concentração de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de esferas.

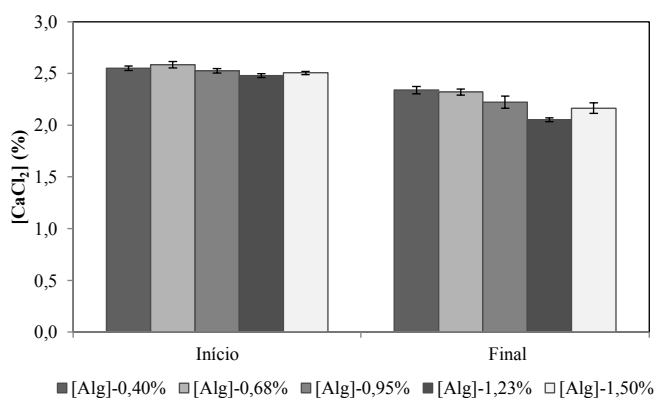


Figura 20. Variação da concentração da solução de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de esferas de alginato, a partir de 1 L de preparado.

Na Figura 21 apresenta-se em termos médios a percentagem de redução da concentração da solução de cloreto de cálcio ao longo do processo de gelificação por difusão, tendo sempre como referência 1 L de preparado.

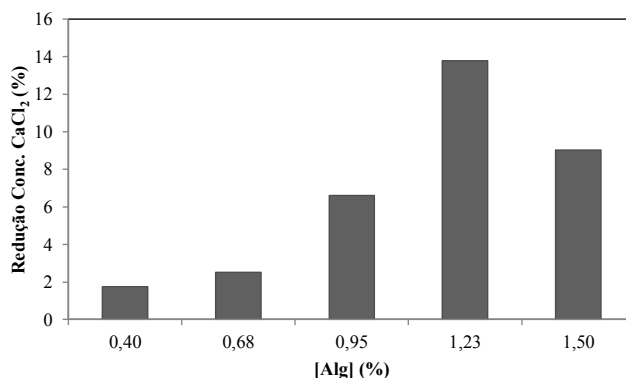


Figura 21. Percentagem média de redução da concentração de cloreto de cálcio ao longo da operação de gelificação por difusão com a concentração de alginato usada na formulação do preparado.

4.1.2.3. Caraterização das esferas de alginato

Na segunda etapa do trabalho as esferas produzidas em cada ensaio foram caraterizadas através da sua massa, firmeza, adesividade, esfericidade e perfil de textura. Os resultados obtidos referentes a estes parâmetros bem como a análise estatística efetuada a cada um deles encontram-se apresentados na Tabela 10.

Pela análise da Tabela 10 verifica-se que os *p-value* obtidos são em geral inferiores ao nível de significância $\alpha = 0,05$ definido, indicando assim que há diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de cada fator comparados, à exceção do fator temperatura do preparado quando se refere às variáveis dependentes adesividade, elasticidade e esfericidade das esferas. Percebe-se ainda que há interação significativa entre os fatores fixos, nomeadamente entre a concentração de alginato e a temperatura do preparado excetuando novamente os casos das variáveis dependentes anteriormente mencionadas.

No que se refere à concentração de alginato e à sua contribuição individual para as características das esferas verifica-se que, comparando os preparados com diferentes níveis de concentração de alginato aqueles que tiverem uma concentração mais elevada deste composto dão origem a esferas com massa, firmeza, fraturabilidade, coesividade, gomosidade e resiliência elevadas sendo também mais adesivas, menos elásticas e mais próximas de se poderem considerar perfeitamente esféricas. Relativamente à temperatura do preparado e à sua contribuição individual para as características das esferas verifica-se que este fator tem uma influência variável e distinta em cada uma das variáveis dependentes estudadas.

Tabela 10. Caracterização das esferas produzidas e análise estatística dos parâmetros avaliados.

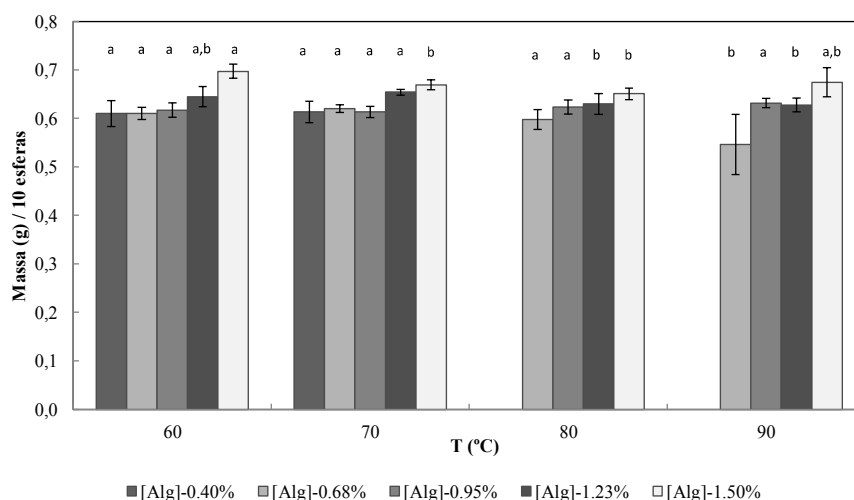
Fatores	Níveis	Parâmetros Avaliados									
		Massa (g)	Firmeza (N)	Adesividade (N)	Fraturabilidade (N)	Elasticidade (%)	Coevisidade (%)	Gomosidade (N)	Mastigabilidade (N)	Resiliência (%)	Esfericidade
Alginato	0,40	0,61±0,02 ^c	23±5 ^e	-0,33±0,05 ^a	23±1 ^e	94,7±1,7 ^b	17±2 ^e	3,9±0,5 ^e	3,7±0,5 ^e	2,0±0,2 ^e	1,16±0,15 ^a
	0,68	0,59±0,04 ^d	46±6 ^d	-0,38±0,05 ^b	41±4 ^d	97,9±0,5 ^a	27±3 ^d	11,2±1,2 ^d	11,0±1,1 ^d	6,0±0,9 ^d	1,11±0,09 ^b
	0,95	0,62±0,01 ^c	63±6 ^c	-0,40±0,04 ^b	62±4 ^c	98,2±3,7 ^a	36±4 ^c	22,7±2,8 ^c	22,3±2,7 ^c	10,0±1,6 ^c	1,09±0,08 ^c
	1,23	0,64±0,02 ^b	86±10 ^b	-0,43±0,04 ^c	74±10 ^b	99,4±0,2 ^a	49±5 ^b	37,1±6,4 ^b	36,9±6,4 ^b	16,1±2,5 ^b	1,08±0,06 ^c
	1,50	0,67±0,02 ^a	109±6 ^a	-0,49±0,04 ^d	81±16 ^a	94,3±9,6 ^b	58±5 ^a	47,3±6,7 ^a	44,7±8,6 ^a	22,0±3,1 ^a	1,07±0,08 ^c
Temp. prep. (°C)	60	0,64±0,04 ^a	64±29 ^b	-0,41±0,06 ^a	49±20 ^d	96,8±6,0 ^a	37±15 ^c	24,0±16,0 ^b	23,2±15,6 ^b	11,2±7,2 ^c	1,11±0,11 ^a
	70	0,63±0,03 ^b	64±28 ^b	-0,39±0,05 ^a	51±21 ^c	97,1±4,2 ^a	37±15 ^c	22,9±15,4 ^b	22,3±15,0 ^b	11,1±7,6 ^c	1,10±0,10 ^{a,b}
	80	0,63±0,03 ^{b,c}	77±26 ^a	-0,43±0,07 ^b	60±13 ^b	96,9±6,5 ^a	45±14 ^a	30,9±14,3 ^a	29,7±13,4 ^a	14,7±7,2 ^a	1,08±0,07 ^b
	90	0,62±0,06 ^c	78±29 ^a	-0,44±0,07 ^b	69±20 ^a	97,8±4,1 ^a	41±12 ^b	31,7±16,0 ^a	31,1±16,0 ^a	12,5±5,9 ^b	1,09±0,08 ^{a,b}
Fatores		<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
Alginato		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Temp. prep. (°C)		0,005	0,011	0,058	<0,001	0,851	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,661
Interação		0,001	<0,001	0,040	<0,001	0,346	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	0,429

Legenda: a – média estatisticamente mais elevada; e – média estatisticamente mais baixa.

Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes e letras iguais significam médias estatisticamente iguais dentro do mesmo fator.

Uma vez que, na maioria dos casos, se observaram interações significativas entre os fatores fixos, nomeadamente concentração de alginato e temperatura do preparado, efetuou-se a separação/comparação de médias separadamente dentro de cada fator, para cada parâmetro, fixando-se a concentração de alginato e variando-se a temperatura do preparado, utilizando o teste de Duncan a $\alpha = 0,05$.

O resultado desta análise para a caracterização das esferas relativamente à massa apresenta-se na Figura 22.



Nota: Não foi realizada a medição da massa das esferas no caso dos ensaios com [Alg] – 0,40% a temperaturas 80 e 90°C porque não se obtiveram esferas consistentes mas uma “pasta”.

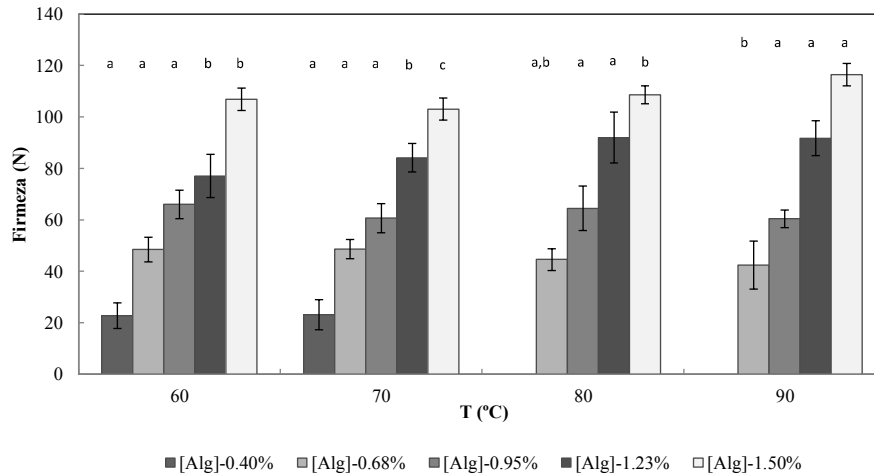
Figura 22. Variação da massa das esferas com a concentração de alginato e com a temperatura do preparado e análise estatística associada.

Pela análise estatística efetuada verifica-se que fixando a concentração de alginato apenas existem diferenças significativas entre as médias obtidas dentro de cada nível de temperatura nos casos em que a concentração de alginato é igual a 0,68 e 1,50 % (m/m), uma vez que nessas situações se obteve $p\text{-value} < 0,05$. Nestas situações, a massa das esferas obtidas é superior quando a temperatura do preparado é mais baixa.

Os resultados obtidos relativos aos parâmetros de textura nomeadamente firmeza e adesividade das esferas apresentam-se na Figura 23 e Figura 24.

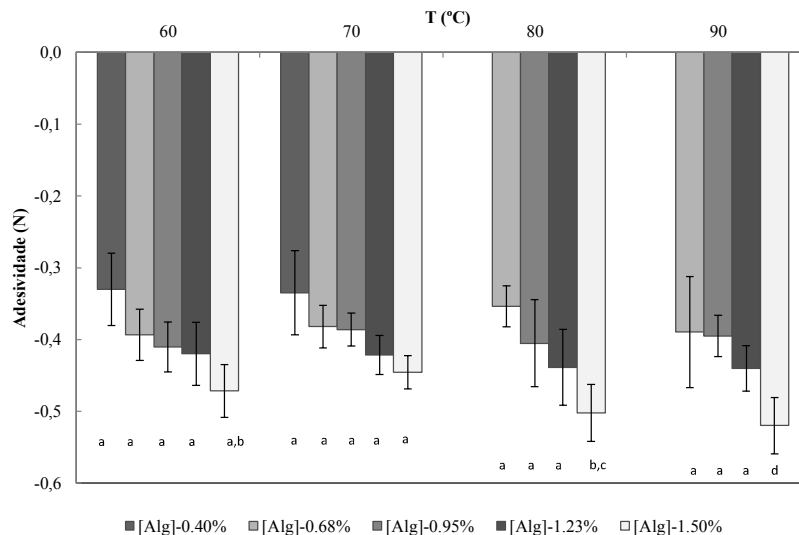
Pela análise estatística efetuada verifica-se que fixando a concentração de alginato apenas existem diferenças (altamente) significativas entre as médias de firmeza obtidas dentro de cada nível de temperatura do preparado nos casos em que a concentração de alginato é igual a 1,23 e 1,50 % (m/m), uma vez que nesses casos se obteve $p\text{-value}$

<0,001. No caso das médias de adesividade obtidas só se verifica esta situação quando a concentração de alginato é 1,50 % (m/m), não existindo diferenças significativas nos restantes casos. Deste modo quando a temperatura do preparado é elevada obtém-se esferas com valores de firmeza e adesividade superiores.



Nota: Não foi realizada a medição da firmeza das esferas no caso dos ensaios com [Alg] – 0,40% a temperaturas 80 e 90°C porque não se obtiveram esferas consistentes mas uma “pasta”.

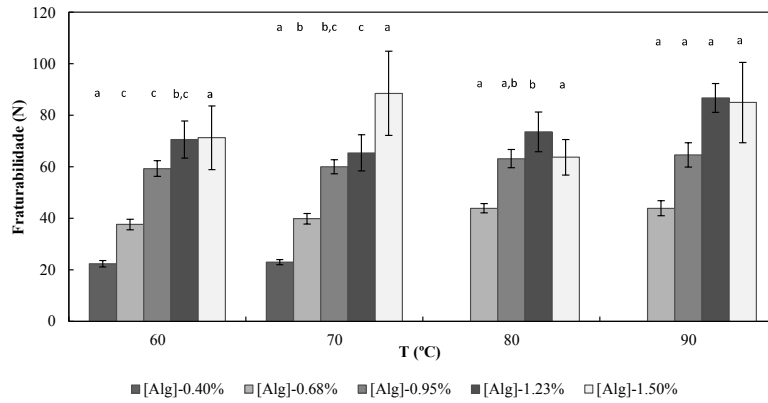
Figura 23. Variação da firmeza das esferas com a concentração de alginato e com a temperatura do preparado e análise estatística associada.



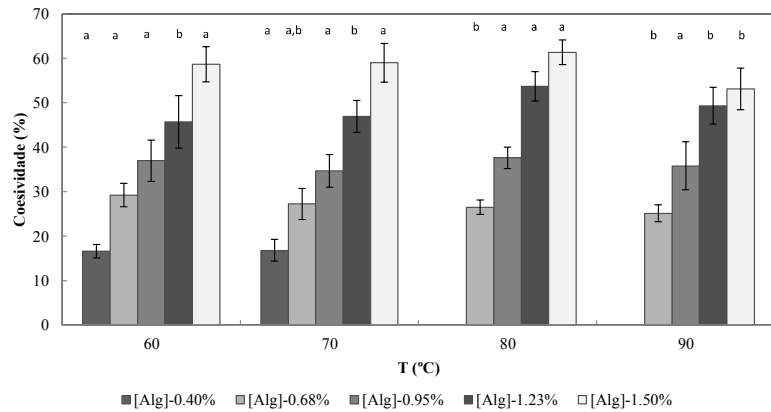
Nota: Não foi realizada a medição da adesividade das esferas no caso dos ensaios com [Alg] – 0,40% a temperaturas 80 e 90°C porque não se obtiveram esferas consistentes mas uma “pasta”.

Figura 24. Variação da adesividade das esferas com a concentração de alginato e com a temperatura do preparado e análise estatística associada.

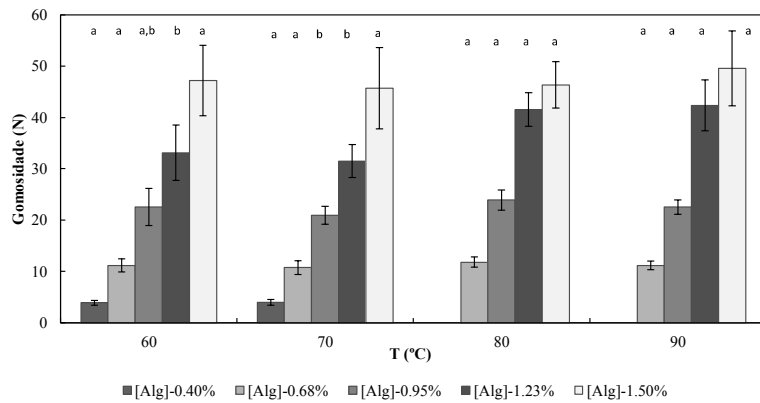
No que se refere aos parâmetros que constituem o perfil de textura das esferas os resultados obtidos são apresentados na Figura 25.



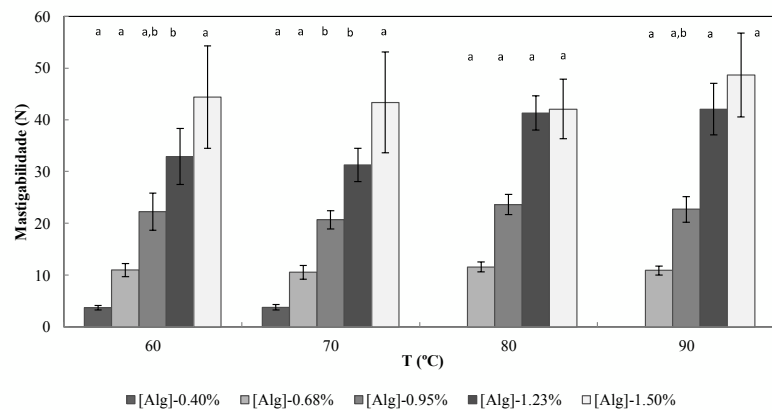
(i)



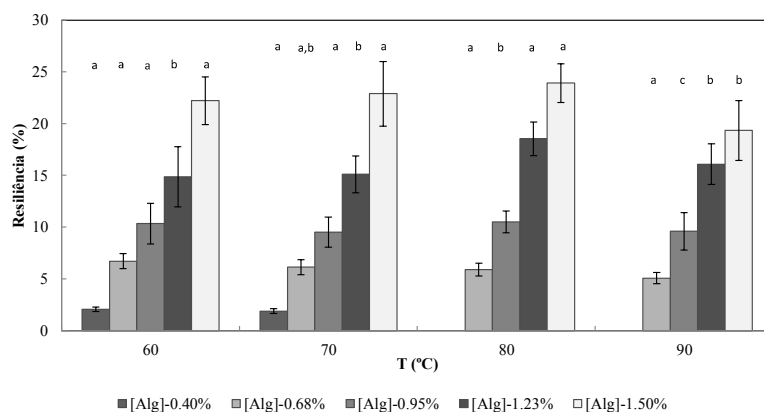
(ii)



(iii)



(iv)



(v)

Nota: Não foram realizadas as medições dos parâmetros do perfil de textura das esferas no caso dos ensaios com [Alg] – 0,40% a temperaturas 80 e 90°C porque não se obtiveram esferas consistentes mas uma “pasta”.

Figura 25. Variação da fraturabilidade (i), coesividade (ii), gomosidade (iii), mastigabilidade (iv) e resiliência (v) das esferas de alginato com a concentração de alginato e com a temperatura do preparado e análise estatística associada.

Pela análise da Figura 25 e da estatística efetuada verifica-se que fixando a concentração de alginato e variando os níveis de temperatura o seu efeito nas médias obtidas nas variáveis dependentes é distinto. Analisando cada variável dependente individualmente percebe-se que existem diferenças significativas entre as médias de fraturabilidade (i) obtidas dentro de cada nível de temperatura nos casos em que a concentração de alginato é igual a 0,68, 0,95 e 1,23 % (m/m) pois os valores de *p-value* obtidos são inferiores a 0,05, notando-se ainda que a fraturabilidade das esferas é superior quando a temperatura do preparado é mais elevada. No caso da coesividade (ii) e resiliência (v) verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias obtidas dentro de cada nível de temperatura nos casos em que a concentração é igual a 0,68, 1,23 e 1,50 % (m/m) pois os valores de *p-value* obtidos são inferiores ao nível

de significância definido. No caso da gomosidade (iii) e mastigabilidade (iv) apenas se verificam diferenças altamente significativas entre as médias obtidas dentro de cada nível de temperatura no caso em que a concentração de alginato é igual a 1,23 % (m/m), apresentando estes parâmetros mais elevados quando a temperatura do preparado é mais alta.

Deste modo a principal conclusão a retirar da segunda etapa do trabalho é que a temperatura do preparado tem principalmente efeito na eficiência, na produtividade e no tempo de operação e um efeito pouco significativo nas características das esferas.

4.1.3. Tipo de alginato

O objetivo do trabalho na terceira etapa consistiu em avaliar a influência do tipo de alginato na produção de esferas de alginato.

Posteriormente são apresentados os resultados que permitem caracterizar as diferentes soluções de alginato (preparados) bem como as esferas de alginato produzidas em cada um dos ensaios.

4.1.3.1. Caracterização da solução de alginato original

Em cada ensaio, correspondente a um tipo de alginato distinto, com concentração de alginato igual a 0,95% (m/m) avaliaram-se diferentes parâmetros à semelhança do descrito em 4.1.1.1, incluindo o tempo que durou a operação de gelificação por difusão de 1,5 litros de preparado, em cada ensaio. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros avaliados durante a preparação das diferentes versões de preparado.

Tipo de Alginato	TSS (°Brix)	pH	Viscosidade (cP)	Duração operação (min)
Alg_001	56,5	4,68	600	14,1
Alg_002	60,2	4,70	960	11,5
Am_001	62,9	4,70	1540	17
Am_002	64,5	4,76	700	17
Am_003	65,3	4,73	1780	21
Am_004	62,9	4,64	1820	17

Pela análise da Tabela 11 verifica-se que, de todos os alginatos testados, o alginato Alg_001 origina preparados menos viscosos e as amostras Am_003 e Am_004 são as que produzem soluções com maior viscosidade. Como esperado, os maiores valores de viscosidade das soluções levam ao aumento do tempo que demora a operação de gelificação por difusão e, conseqüentemente, a escolha do alginato dependerá deste fator que influencia a exequibilidade da operação.

4.1.3.2. Caraterização das esferas de alginato

Na terceira etapa do trabalho as esferas produzidas em cada ensaio foram caraterizadas através da sua massa, firmeza, adesividade e perfil de textura. Os resultados obtidos referentes a estes parâmetros bem como a análise estatística efetuada a cada um deles encontram-se apresentados na Tabela 12.

Pela análise da Tabela 12 verifica-se que os *p-value* obtidos são em geral inferiores ao nível de significância $\alpha = 0,05$ definido, indicando assim que há diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tipos de alginatos. A exceção, ou seja, a variável dependente na qual os diferentes tipos de alginatos não implicam diferenças significativas é a elasticidade das esferas.

Analisando individualmente cada uma das variáveis dependentes percebe-se que as esferas preparadas com o alginato Alg_001 são as que apresentam valores superiores de massa e por sua vez, a amostra Am_004 originou esferas com valores de massa inferiores às produzidas com os restantes alginatos. No entanto, os dois tipos de alginatos anteriormente mencionados originaram as esferas com maior firmeza e a amostra Am_002 as esferas com valores de firmeza inferiores. As esferas mais adesivas são as produzidas com o alginato Alg_001 e as que apresentam menor adesividade são as preparadas com a amostra Am_003. Relativamente aos parâmetros que definem o perfil de textura das esferas de alginato, as esferas produzidas com o alginato Alg_001 são as que apresentam maior resistência à fratura, maior elasticidade, maior gomosidade e mastigabilidade mas no que se refere aos parâmetros de coesão e resiliência as esferas produzidas com o alginato Alg_002 apresentam valores superiores.

Tabela 12. Caracterização das esferas produzidas e análise estatística dos parâmetros avaliados.

Fator	Códigos	Parâmetros Avaliados								
		Massa (g)	Firmeza (N)	Adesividade (N)	Fraturabilidade (N)	Elasticidade (%)	Coevisidade (%)	Gomosidade (N)	Mastigabilidade (N)	Resiliência (%)
Tipo Alginato	Alg_001	0,62±0,01 ^a	64±9 ^a	-0,41±0,06 ^c	62±3 ^a	98,8±0,3 ^a	37,0±2,8 ^b	23,2±2,2 ^a	22,9±2,1 ^a	10,2±1,3 ^b
	Alg_002	0,60±0,04 ^{a,b,c}	56±5 ^b	-0,32±0,02 ^b	42±4 ^b	98,1±1,0 ^{a,b}	45,7±8,5 ^a	20,0±3,8 ^b	19,6±3,7 ^b	13,9±3,6 ^a
	Am_001	0,59±0,01 ^{b,c,d}	58±5 ^b	-0,33±0,02 ^b	39±2 ^b	93,6±1,7 ^b	29,2±4,0 ^b	12,2±1,7 ^c	11,4±1,7 ^b	7,1±1,1 ^c
	Am_002	0,57±0,02 ^{c,d}	38±5 ^d	-0,31±0,02 ^{a,b}	18±1 ^d	94,9±1,3 ^{a,b}	16,1±1,7 ^c	3,0±0,4 ^d	2,8±0,4 ^d	2,7±0,6 ^d
	Am_003	0,60±0,02 ^{a,b}	48±7 ^c	-0,29±0,01 ^a	21±2 ^d	93,7±2,2 ^b	14,8±0,5 ^c	3,4±0,2 ^d	3,2±0,2 ^d	2,3±0,1 ^d
	Am_004	0,56±0,01 ^d	66±5 ^a	-0,34±0,02 ^b	34±3 ^c	96,3±0,7 ^{a,b}	26,7±2,9 ^b	9,9±2,0 ^c	9,5±2,0 ^b	6,0±1,5 ^c
Fator		<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
Tipo Alginato		0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,076	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Legenda: a – média estatisticamente mais elevada; e – média estatisticamente mais baixa.

Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes e letras iguais significam médias estatisticamente iguais dentro do mesmo fator.

Em geral, analisando os resultados de todos os ensaios efetuados nesta etapa do trabalho, concluiu-se que o alginato Alg_001, já utilizado pela Frulact na produção de esferas de alginato é, de facto, o mais indicado uma vez que origina preparados menos viscosos, proporcionando vantagens a nível da produtividade pois diminui o tempo necessário para realizar a operação, e esferas com massa superior e propriedades texturais mais adequadas nomeadamente firmeza superior, maior resistência à fratura e maior elasticidade.

Estes resultados implicam que caso venha a ser relevante e/ou necessário usar um alginato distinto do usado neste trabalho (Alg_001), será necessário em cada caso um processo de otimização individual das condições de utilização.

É importante salientar que, uma vez que os ensaios indicaram que o Alg_001 seria o mais indicado para o produto em causa, não foram realizados estudos posteriores comparativos acerca da esfericidade das esferas produzidas pelos diferentes tipos de alginatos, tendo-se optado por estudar a influência de outros fatores nas características das esferas.

4.1.4. Tratamento térmico

4.1.4.1. Fase A

Na quarta etapa do trabalho pretendeu-se avaliar a influência do tratamento térmico nomeadamente da temperatura e do tempo de pasteurização na produção de esferas de alginato.

De seguida são apresentados os resultados que permitem caracterizar a solução de alginato original (preparado) e a solução de cloreto de cálcio utilizada no processo de gelificação por difusão bem como as esferas de alginato produzidas em cada um dos ensaios.

4.1.4.1.1. Caracterização da solução de alginato original

Em cada ensaio, correspondente a um conjunto de temperatura e tempo de pasteurização distinto avaliaram-se diferentes parâmetros nomeadamente o teor em sólidos solúveis, o pH e a viscosidade do preparado a 75 °C ($n = 1$). Além disso avaliou-se o tempo

que durou a operação de gelificação por difusão de 1 litro de preparado, em cada ensaio. Os resultados obtidos para cada um dos parâmetros acima mencionados são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Parâmetros avaliados durante a preparação das diferentes versões de preparado.

T_P (°C)	t_P (min)	TSS (° Brix)	pH	Viscosidade (cP)	Duração operação (min.)
85	3	59,4	4,76	1420	25
	6	63,4	4,62	1720	19
	9	64,3	4,54	2480	24
90	3	67,5	4,68	2280	24
	6	61,7	4,59	2020	21
	9	63,8	4,56	2700	30
95	3	65,5	4,53	3480	29
	6	69,2	4,57	4380	38
	9	63,4	4,61	2080	23
100	3	62,2	4,96	3120	33
	6	65,8	4,76	3100	34
	9	63,1	4,74	2220	28

Pela análise da Tabela 13 verifica-se que as variações que ocorrem nos valores dos parâmetros teor em sólidos solúveis, pH, viscosidade e duração da operação entre cada um dos ensaios são algo aleatórias não se conseguindo perceber um comportamento padrão dependente das condições em que ocorre a pasteurização. Nomeadamente, quando se analisa a viscosidade dos preparados, aquando da realização da pasteurização a 85 e 90 °C a viscosidade dos preparados aumenta com o tempo de pasteurização, o que não se verifica para as temperaturas de 95 e 100 °C. Deste modo, estes resultados são inconclusivos não sendo possível avaliar o efeito das condições de pasteurização nestes parâmetros.

4.1.4.1.2. Caraterização da solução de cloreto de cálcio

A condutividade da solução de cloreto de cálcio sobre a qual se procedeu ao processo de gelificação por difusão do preparado foi avaliada no início e no final da operação, encontrando-se os valores médios obtidos na Figura 26.

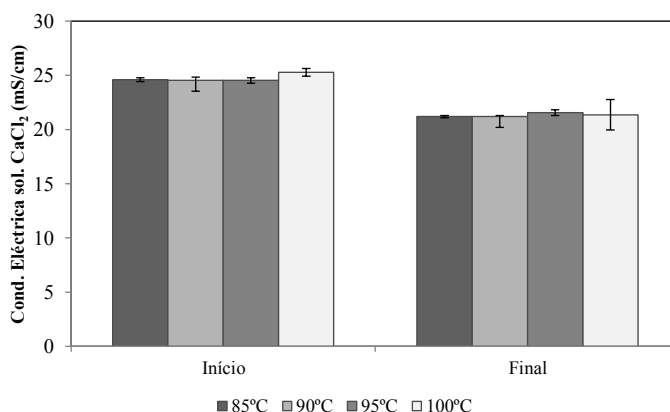


Figura 26. Variação da condutividade da solução de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de esferas de alginato, a partir de 1 L de preparado.

Como já mencionado no ponto 3.2.4 a condutividade elétrica varia com a concentração de substâncias ionizadas dissolvidas na água, e como tal era expectável que à medida que o cloreto de cálcio reage com o alginato durante a operação de gelificação, a sua concentração vá diminuindo e consequentemente a condutividade, como pode ser observado na Figura 26.

Para se compreender em termos de concentração a diferença que existe nos valores de condutividade medidos obteve-se uma reta de calibração (Figura 19) que se traduz pela seguinte equação $Cond. El. = 9,5095[CaCl_2] + 1,4613$, relacionando a condutividade e a concentração de soluções de cloreto de cálcio. Deste modo, com base nos valores de condutividade medidos e na reta de calibração obtida calculou-se a concentração de cloreto de cálcio respetiva e na Figura 27 apresenta-se a variação da concentração de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de esferas.

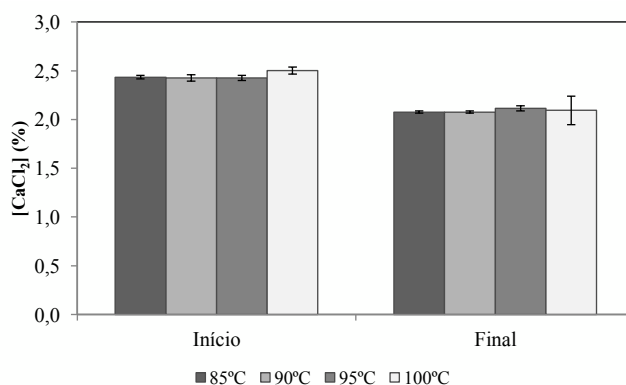


Figura 27. Variação da concentração da solução de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de esferas de alginato, a partir de 1 L de preparado.

Na Figura 28 apresenta-se em termos médios a percentagem de redução da concentração da solução de cloreto de cálcio ao longo do processo de gelificação por difusão, tendo sempre como referência 1 L de preparado.

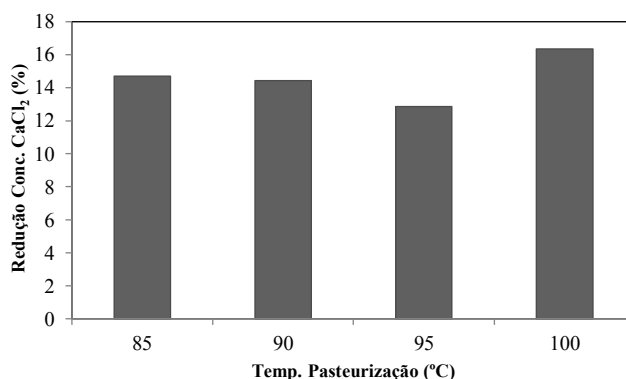


Figura 28. Percentagem média de redução da concentração de cloreto de cálcio ao longo da operação de gelificação por difusão com a temperatura de pasteurização do preparado.

4.1.4.1.3. Caraterização das esferas de alginato

Na quarta etapa do trabalho as esferas produzidas em cada ensaio foram caraterizadas através da sua massa, firmeza, adesividade, esfericidade e perfil de textura. Os resultados obtidos referentes a estes parâmetros bem como a análise estatística efetuada a cada um deles encontram-se apresentados na Tabela 14.

Pela análise da Tabela 14 verifica-se que os *p-value* obtidos relativos ao fator fixo temperatura de pasteurização são em geral inferiores a 0,05, excetuando os casos das variáveis dependentes resiliência e esfericidade, indicando deste modo que na maioria dos parâmetros existem diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de temperatura comparados. No que se refere ao fator fixo tempo de pasteurização apenas se verificam diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de tempo comparados no caso em que as variáveis dependentes são a massa, a adesividade, a gomosidade, a mastigabilidade e a resiliência das esferas. Percebe-se ainda que há interação significativa entre os fatores fixos, nomeadamente entre a temperatura e o tempo de pasteurização excetuando no caso das variáveis dependentes elasticidade e coesividade das esferas. Deste modo, percebe-se que a contribuição individual de cada um dos fatores analisados para as características das esferas tem uma influência variável e distinta em cada uma das variáveis dependentes estudadas.

Tabela 14. Caracterização das esferas produzidas e análise estatística dos parâmetros avaliados.

Fatores	Níveis	Parâmetros Avaliados									
		Massa (g)	Firmeza (N)	Adesividade (N)	Fraturabilidade (N)	Elasticidade (%)	Coerividade (%)	Gomosidade (N)	Mastigabilidade (N)	Resiliência (%)	Esfericidade
Temperatura (°C)	85	0,60±0,02 ^c	83±6 ^a	-0,48±0,06 ^c	62±9 ^a	98±2 ^a	44±6 ^{b,c}	29±5 ^a	29±5 ^a	13±2 ^a	1,07±0,06 ^a
	90	0,60±0,02 ^c	80±7 ^b	-0,46±0,04 ^b	59±6 ^{a,b}	92±10 ^b	46±4 ^{a,b}	30±4 ^a	28±5 ^{a,b}	13±2 ^a	1,08±0,07 ^a
	95	0,66±0,02 ^a	74±8 ^c	-0,41±0,03 ^a	57±9 ^b	97±6 ^a	47±6 ^a	28±4 ^a	27±5 ^{a,b}	14±2 ^a	1,09±0,10 ^a
	100	0,64±0,02 ^b	78±5 ^b	-0,46±0,04 ^b	57±7 ^b	98±4 ^a	43±6 ^c	26±4 ^b	26±4 ^b	13±2 ^a	1,07±0,07 ^a
Tempo (min)	3	0,61±0,04 ^b	80±6 ^a	-0,44±0,04 ^a	59±6 ^a	96±8 ^a	44±6 ^b	28±4 ^b	27±4 ^b	13±2 ^b	1,09±0,07 ^a
	6	0,63±0,03 ^a	79±6 ^a	-0,44±0,04 ^a	58±8 ^a	97±7 ^a	45±5 ^{a,b}	27±4 ^b	27±5 ^b	13±2 ^{a,b}	1,08±0,09 ^a
	9	0,62±0,02 ^a	78±10 ^a	-0,48±0,06 ^b	60±10 ^a	96±7 ^a	47±6 ^a	30±5 ^a	29±6 ^a	14±2 ^a	1,07±0,06 ^a
Fatores		<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
Temperatura (°C)		<0,001	<0,001	<0,001	0,032	<0,001	0,008	0,001	0,037	0,188	0,182
Tempo (min)		0,004	0,524	<0,001	0,393	0,961	0,056	0,005	0,027	0,060	0,086
Interação		0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,065	0,163	<0,001	<0,001	0,019	0,028

Legenda: a – média estatisticamente mais elevada; e – média estatisticamente mais baixa.

Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes e letras iguais significam médias estatisticamente iguais dentro do mesmo fator.

Uma vez que, na maioria dos casos, se observaram interações significativas entre os fatores fixos, nomeadamente temperatura e tempo de pasteurização, efetuou-se a separação/comparação de médias separadamente dentro de cada fator, para cada parâmetro, fixando-se o tempo de pasteurização e variando-se a temperatura de pasteurização, utilizando o teste de Duncan a $\alpha = 0,05$.

O resultado desta análise para a caracterização das esferas relativamente à massa apresenta-se na Figura 29.

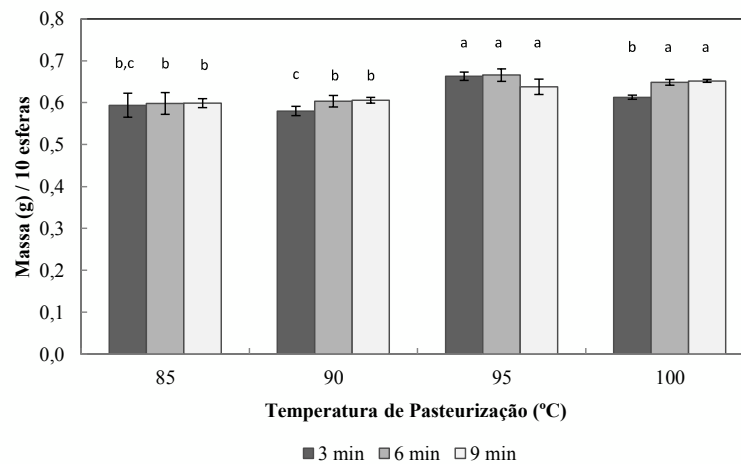


Figura 29. Variação da massa das esferas com a temperatura e tempo de pasteurização e análise estatística associada.

Pela análise estatística efetuada verifica-se que fixando o tempo de pasteurização existem diferenças altamente significativas entre as médias de massa obtidas dentro de cada nível de temperatura de pasteurização uma vez que em todas as situações se obtiveram valores de $p\text{-value} < 0,001$. Em geral, a massa das esferas é superior nos casos em que a temperatura de pasteurização é mais elevada.

Os resultados obtidos relativos aos parâmetros de textura nomeadamente firmeza e adesividade das esferas apresentam-se na Figura 30 e Figura 31.

Pela análise estatística efetuada verifica-se que fixando o tempo de pasteurização existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias de firmeza e adesividade obtidas dentro de cada nível de temperatura de pasteurização comparados (excetuando o caso do tempo de pasteurização fixo em 6 minutos referente à variável dependente adesividade) uma vez que os valores de $p\text{-value}$ obtidos são inferiores ao nível de significância definido, $\alpha = 0,05$.

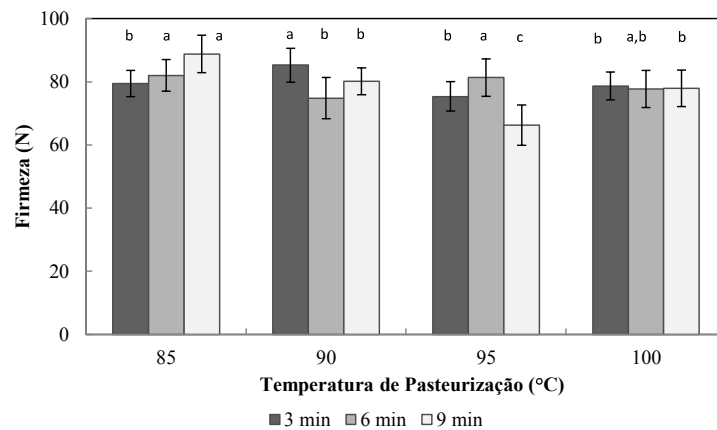


Figura 30. Variação da firmeza das esferas com a temperatura e tempo de pasteurização e análise estatística associada.

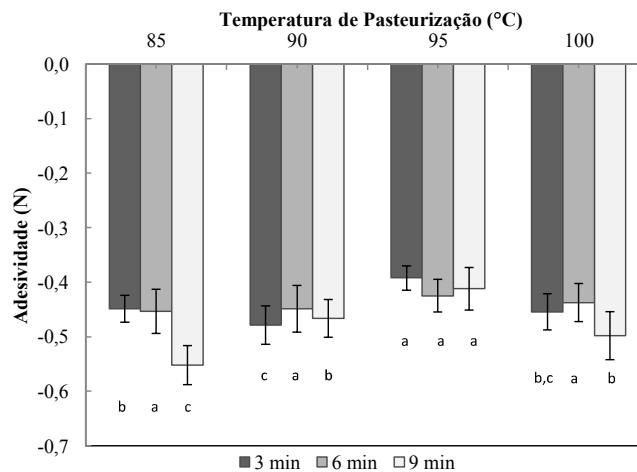


Figura 31. Variação da adesividade das esferas com a temperatura e tempo de pasteurização e análise estatística associada.

Os resultados obtidos para a esfericidade das esferas formadas em cada caso são apresentados na Figura 32.

Pela análise estatística efetuada verifica-se que fixando o tempo de pasteurização apenas existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias de esfericidade obtidas dentro de cada nível de temperatura de pasteurização no caso em que a pasteurização decorreu durante 3 minutos, uma vez que apenas nesse caso o valor de *p-value* <0,05. Saliente-se ainda que em nenhum dos casos estudados as esferas podem ser consideradas perfeitamente esféricas porque os valores obtidos são todos superiores a 1.

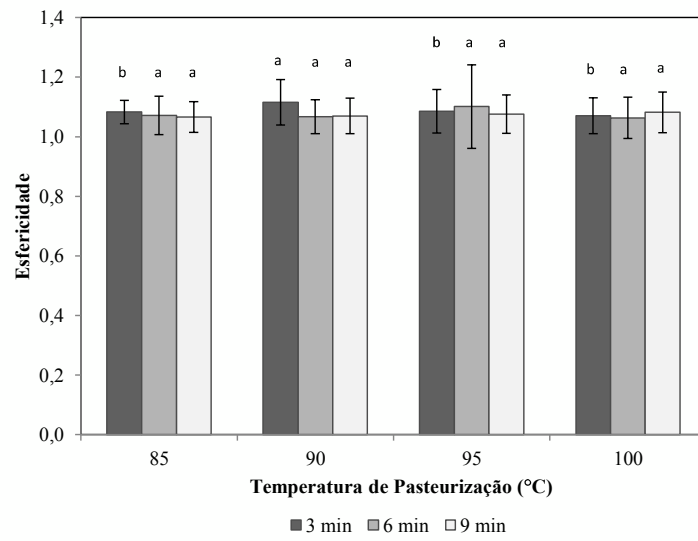
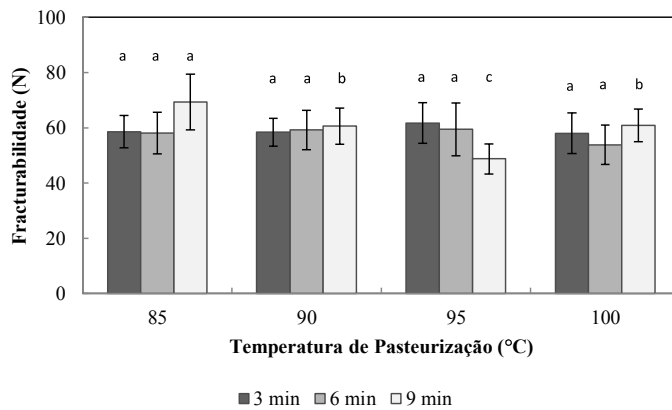
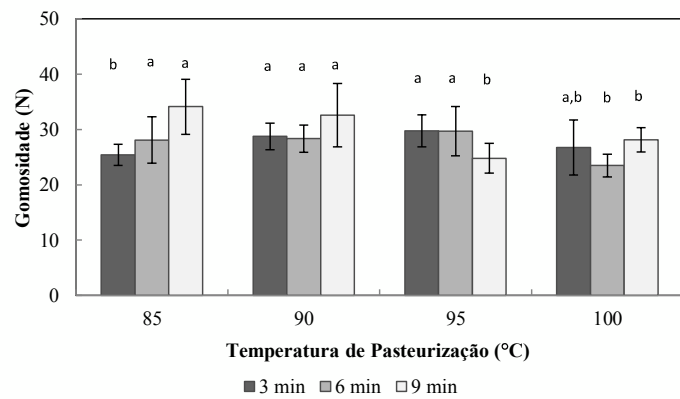


Figura 32. Variação da esfericidade das esferas com a temperatura e tempo de pasteurização e análise estatística associada.

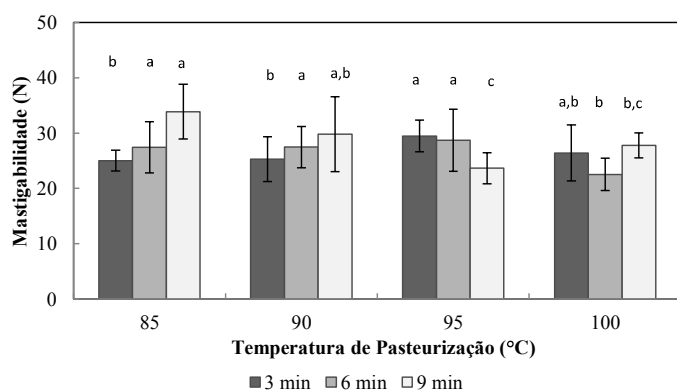
No que se refere aos parâmetros que constituem o perfil de textura das esferas os resultados obtidos são apresentados na Figura 33.



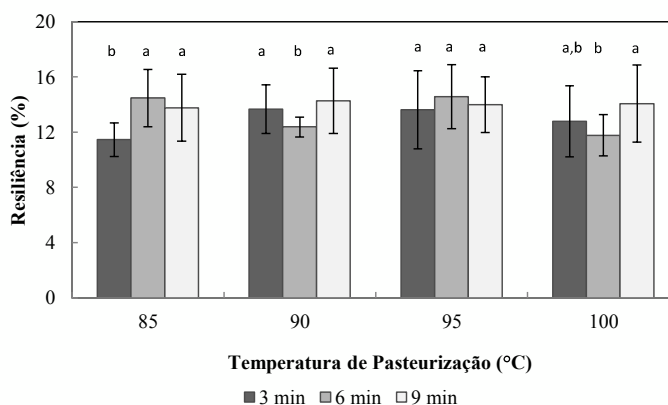
(i)



(ii)



(iii)



(iv)

Figura 33. Variação da fraturabilidade (i), gomosidade (ii), mastigabilidade (iii) e resiliência (iv) das esferas de alginato com a temperatura e tempo de pasteurização e análise estatística associada.

Pela análise da Figura 33 e da estatística efetuada verifica-se que fixando o tempo de pasteurização e variando os níveis de temperatura de pasteurização o seu efeito nas médias das variáveis dependentes obtidas é distinto.

Analisando cada variável dependente individualmente percebe-se que apenas existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias de fraturabilidade (i) obtidas dentro de cada nível de temperatura no caso em que a pasteurização ocorreu durante 9 minutos uma vez que apenas neste caso $p\text{-value} < 0,05$, notando-se que a resistência à fratura das esferas resulta superior quando a temperatura de pasteurização é a mais baixa. Relativamente à gomosidade (ii) e mastigabilidade (iii) verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias obtidas dentro de cada nível de temperatura de pasteurização uma vez que os valores de $p\text{-value}$ obtidos em todas as situações são inferiores ao nível de significância definido. No caso das médias de resiliência (iv) obtidas apenas se verificam diferenças estatisticamente significativas dentro de cada nível de

temperatura de pasteurização no caso em que a pasteurização ocorreu durante 6 minutos uma vez que $p\text{-value} < 0,05$.

Deste modo a principal conclusão a retirar dos resultados obtidos na quarta etapa do trabalho é que não se conseguiu estabelecer um modelo que relacione as condições de pasteurização e as características das esferas obtidas nessas condições. Para tentar contornar este facto e perceber melhor este efeito realizaram-se no âmbito desta etapa ensaios adicionais cujos resultados são apresentados no ponto 4.1.4.2.

4.1.4.2. Fase B

Nos ensaios adicionais englobados na quarta etapa do trabalho pretendeu-se avaliar a influência da temperatura de pasteurização na viscosidade do preparado, mas realizando estas medições com os preparados sempre à mesma temperatura, nomeadamente 70 °C. Além disso pretendeu-se comparar o efeito da incorporação de um amido distinto daquele que se utilizou em todos os ensaios anteriores (formulação base – Tabela 3), especificamente um amido modificado de milho considerado mais resistente a temperaturas elevadas.

De seguida são apresentados os resultados obtidos nos ensaios adicionais mencionados, que permitem caraterizar a solução de alginato original (preparado) bem como as esferas de alginato produzidas em cada um dos ensaios.

4.1.4.2.1. Caraterização da solução de alginato original

Em cada ensaio, correspondente a um conjunto temperatura de pasteurização e tipo de amido mediram-se três réplicas da viscosidade do preparado, após pasteurização e estabilização da temperatura deste a 70 °C. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 34.

Pela análise da Figura 34 e da estatística efetuada verifica-se que o $p\text{-value}$ obtido para o fator fixo temperatura de pasteurização é inferior a 0,001 indicando que existem diferenças altamente significativas entre os níveis de temperatura estudados. É importante referir que a análise estatística para o fator fixo tipo de amido não foi realizada pelo software usado porque o número de grupos em estudo era inferior a 3. Uma vez que se observou interação significativa entre os fatores fixos efetuou-se a separação de médias

separadamente dentro de cada fator para a variável dependente viscosidade, fixando-se o tipo de amido e variando-se a temperatura de pasteurização, utilizando o teste de Duncan a $\alpha = 0,05$.

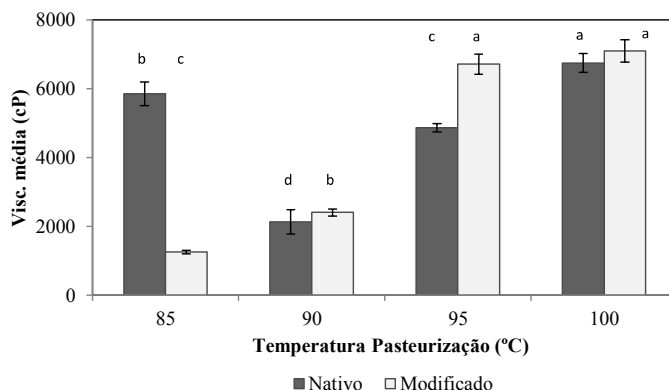


Figura 34. Variação da viscosidade da solução de alginato original (preparado) formulada com dois amidos distintos com a temperatura de pasteurização.

Os resultados desta análise estatística evidenciam que fixando o tipo de amido existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias de viscosidade obtidas dentro de cada nível de temperatura de pasteurização, sendo que os valores de viscosidade superiores se observam nos preparados que foram pasteurizados a 100 °C. No caso do amido nativo de milho a viscosidade apresenta um valor mínimo quando a pasteurização se realiza a 90 °C sendo superior nas restantes temperaturas de pasteurização mas no caso do amido modificado de milho à medida que a temperatura de pasteurização aumenta a viscosidade do preparado também aumenta. Salienta-se ainda o facto que a uma temperatura de pasteurização de 90 °C os preparados têm um valor de viscosidade similar

4.1.4.2.2. Caraterização das esferas de alginato

Nos ensaios adicionais englobados na quarta etapa do trabalho as esferas produzidas em cada um foram caracterizadas através da sua massa, firmeza, adesividade e esfericidade. Os resultados obtidos referentes a estes parâmetros bem como a análise estatística efetuada a cada um deles encontram-se apresentados na Tabela 15.

Pela análise da Tabela 15 verifica-se que os *p-value* obtidos para o fator temperatura de pasteurização são em geral inferiores a 0,001 indicando deste modo que existem diferenças extremamente significativas entre os níveis de temperatura comparados, exceto no caso da variável dependente esfericidade. Relativamente ao fator fixo tipo de amido a

análise não foi realizada pelo software uma vez que o número de grupos em análise era inferior a 3. Verifica-se ainda que há interação significativa entre os fatores fixos, nomeadamente entre a temperatura de pasteurização e o tipo de amido, exceto quando se trata da variável dependente esfericidade uma vez que $p\text{-value} > 0,05$.

Uma vez que se observaram interações significativas entre a temperatura de pasteurização e o tipo de amido, efetuou-se a separação/comparação de médias separadamente dentro de cada fator, para cada parâmetro, fixando-se o tipo de amido e fazendo variar a temperatura de pasteurização, utilizando o teste de Duncan a $\alpha = 0,05$.

Tabela 15. Caraterização das esferas produzidas e análise estatística dos parâmetros avaliados.

Fatores	Níveis	Parâmetros Avaliados			
		Massa (g)	Firmeza (N)	Adesividade (N)	Esfericidade
Temperatura (°C)	85	0,58±0,03 ^c	98±6 ^a	-0,56±0,04 ^c	1,10±0,13 ^{a,b}
	90	0,61±0,02 ^b	83±7 ^{b,c}	-0,50±0,04 ^b	1,12±1,10 ^a
	95	0,57±0,06 ^c	88±8 ^b	-0,53±0,07 ^b	1,08±0,06 ^b
	100	0,67±0,03 ^a	80±9 ^c	-0,45±0,03 ^a	1,10±0,12 ^{a,b}
Tipo Amido	Nativo Modificado	Análise não realizada - número grupos < 3			
Fatores		<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
Temperatura (°C)		<0,001	<0,001	<0,001	0,084
Tipo Amido		<0,001	0,727	0,003	0,076
Interação		0,033	<0,001	<0,001	0,120

Legenda: a – média estatisticamente mais elevada; e – média estatisticamente mais baixa.

Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes e letras iguais significam médias estatisticamente iguais dentro do mesmo fator.

O resultado desta análise para a caraterização das esferas relativamente à massa apresenta-se na Figura 35.

Pela análise estatística efetuada verifica-se que fixando o tipo de amido existem diferenças altamente significativas entre as médias de massa obtidas dentro de cada nível de temperatura de pasteurização, uma vez que em todos os casos se obteve $p\text{-value} < 0,001$. Além disso, verifica-se que o nível de temperatura de pasteurização que origina esferas com massa superior é o mais elevado nomeadamente 100 °C.

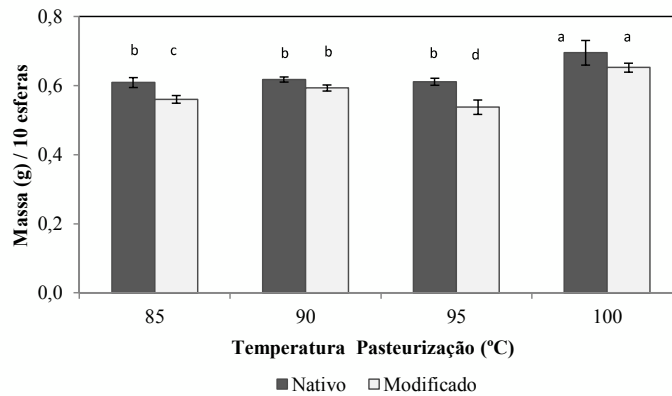
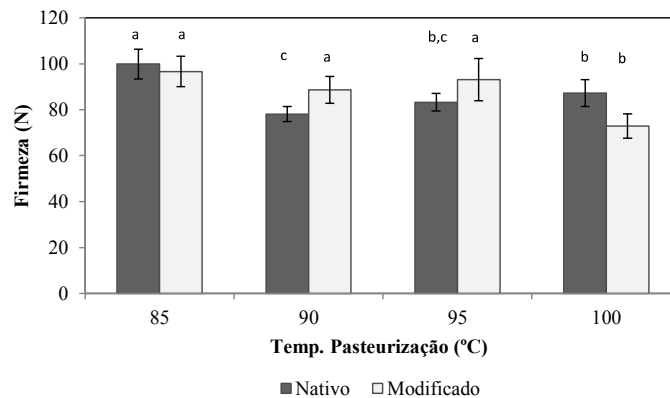


Figura 35. Variação da massa das esferas com o tipo de amido utilizado na formulação e com a temperatura de pasteurização e análise estatística associada.

Relativamente aos parâmetros de textura especificamente firmeza e adesividade das esferas os resultados obtidos apresentam-se na Figura 36.

Pela análise estatística efetuada verifica-se que fixando o tipo de amido existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias de firmeza (i) e adesividade (ii) dentro de cada nível de temperatura de pasteurização, uma vez que em todos os casos $p\text{-value} < 0,05$. Em geral, verifica-se que as esferas pasteurizadas a temperaturas inferiores apresentam valores de firmeza superiores mas por sua vez são mais adesivas.



(i)

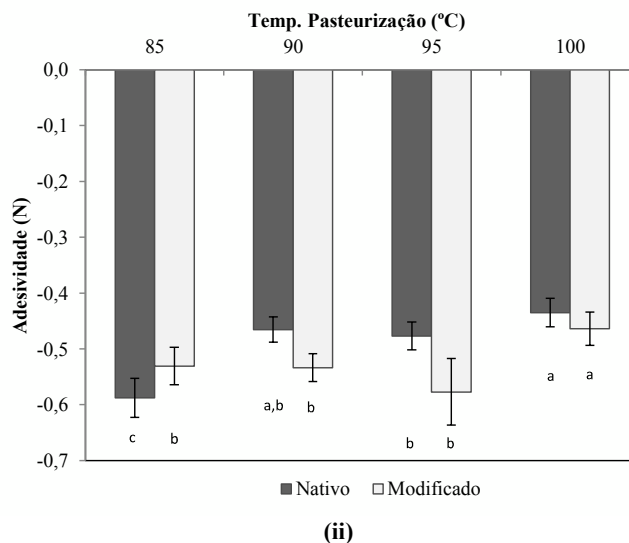


Figura 36. Variação da firmeza (i) e adesividade (ii) das esferas com o tipo de amido utilizado na formulação e com a temperatura de pasteurização e análise estatística associada.

4.1.5. Produção industrial

Na quinta etapa do trabalho pretendeu-se caracterizar três amostras de esferas de alginato já produzidas pela Frulact industrialmente, mencionadas no trabalho pela sua cor final, amarelas, verdes e vermelhas, que se distinguem basicamente pelo corante utilizado na formulação (formulação produto acabado – Tabela 4).

De seguida são apresentados os resultados que permitem caracterizar as soluções de alginato original (preparados) e as soluções de cloreto de cálcio utilizadas no processo de gelificação por difusão bem como as esferas de alginato produzidas em cada uma das versões.

4.1.5.1. Caracterização da solução de alginato original

Em cada ensaio, correspondente a uma versão distinta avaliaram-se diferentes parâmetros nomeadamente o teor em sólidos solúveis e o pH ($n = 1$) e a viscosidade do preparado a 70 °C ($n = 3$). Além disso avaliou-se o tempo que durou a operação de gelificação por difusão dos preparados que, em média, resultou na produção de 160 kg de esferas de alginato em cada versão. Os resultados obtidos para cada um dos parâmetros acima mencionados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Parâmetros avaliados durante a preparação das diferentes versões de preparado.

Versão	TSS (° Brix)	pH	Viscosidade (cP)	Duração operação (min.)
Amarelas	55,0	4,40	480±0 ^b	30
Verdes	56,9	4,35	527±31 ^{a,b}	25
Vermelhas	54,5	4,25	573±31 ^a	26

Pela análise da Tabela 16 e da estatística efetuada à variável dependente viscosidade verifica-se que $p\text{-value} < 0,05$, indicando assim que há diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes versões de esferas produzidas.

4.1.5.2. Caraterização da solução de cloreto de cálcio

A condutividade da solução de cloreto de cálcio sobre a qual se procedeu ao processo de gelificação por difusão do preparado foi avaliada no início e no final da operação, encontrando-se os valores médios obtidos apresentados na Figura 37.

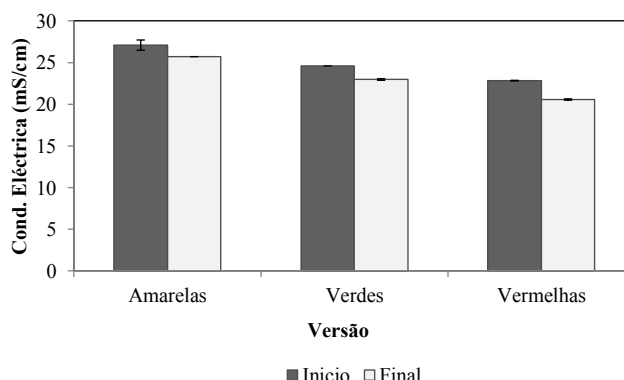


Figura 37. Variação da condutividade da solução de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de 160 kg, em média, de esferas de alginato para cada uma das versões produzidas industrialmente.

Como já mencionado no ponto 3.2.4 a condutividade elétrica varia com a concentração de substâncias ionizadas dissolvidas na água, e como tal era expectável que à medida que o cloreto de cálcio reage com o alginato durante a operação de gelificação, a sua concentração vá diminuindo e consequentemente a condutividade, como pode ser observado na Figura 37.

Para se compreender em termos de concentração a diferença que existe nos valores de condutividade medidos obteve-se uma reta de calibração (Figura 19) que se traduz pela seguinte equação $Cond. El. = 9,5095[CaCl_2] + 1,4613$, relacionando a condutividade e a

concentração de soluções de cloreto de cálcio. Deste modo, com base nos valores de condutividade medidos e na reta de calibração obtida calculou-se a concentração de cloreto de cálcio respectiva e na Figura 38 apresenta-se a variação da concentração de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de esferas.

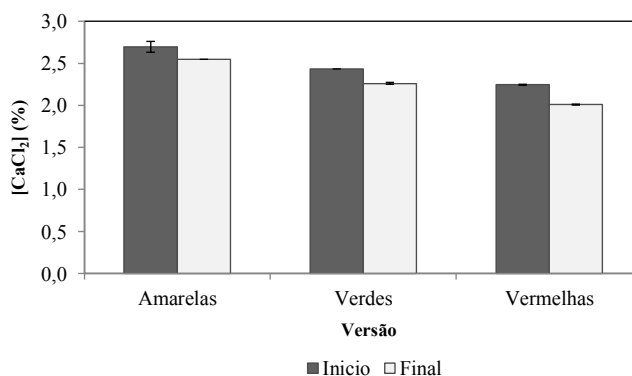


Figura 38. Variação da concentração da solução de cloreto de cálcio ao longo da operação de produção de 160 kg, em média, de esferas de alginato para cada uma das versões produzidas industrialmente.

Na Figura 39 apresenta-se em termos médios a percentagem de redução da concentração da solução de cloreto de cálcio ao longo do processo de gelificação por difusão de cada versão de preparado.

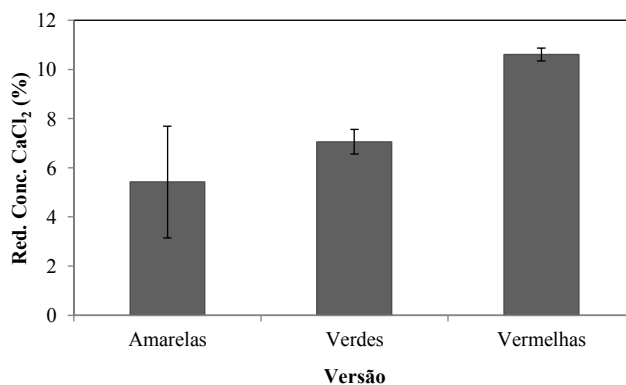


Figura 39. Percentagem média de redução da concentração de cloreto de cálcio ao longo da operação de gelificação por difusão de versões distintas de preparados.

4.1.5.3. Caraterização das esferas de alginato

Na quinta etapa do trabalho as esferas produzidas em cada uma das versões foram caracterizadas através da sua massa, firmeza, adesividade e esfericidade. Os resultados obtidos referentes a estes parâmetros bem como a análise estatística efetuada a cada um deles encontram-se apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Caraterização das esferas produzidas e análise estatística dos parâmetros avaliados.

Fator	Código	Parâmetros Avaliados			
		Massa (g)	Firmeza (N)	Adesividade (N)	Esfericidade
Versão	Amarelas	0,48±0,01 ^b	88±8 ^{a,b}	-0,64±0,07 ^b	1,15±0,13 ^a
	Verdes	0,51±0,01 ^a	82±8 ^b	-0,54±0,08 ^a	1,15±0,13 ^a
	Vermelhas	0,46±0,01 ^c	92±8 ^a	-0,58±0,05 ^a	1,17±0,12 ^a
Fator		<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
Versão		<0,001	0,022	0,009	0,736

Legenda: a – média estatisticamente mais elevada; e – média estatisticamente mais baixa.

Letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes e letras iguais significam médias estatisticamente iguais dentro do mesmo fator.

Pela análise da Tabela 17 e da estatística efetuada verifica-se que, em geral e excetuando a variável dependente esfericidade, os *p-value* obtidos são inferiores a $\alpha = 0,05$, indicando assim que há diferenças estatisticamente significativas entre as versões de esferas de alginato produzidas.

Analisando individualmente cada uma das variáveis dependentes percebe-se que as esferas verdes são as que apresentam valores superiores de massa, já as que apresentam maior firmeza são as esferas vermelhas e as esferas mais adesivas são as amarelas. Relativamente à esfericidade salienta-se que em nenhuma das versões produzidas se obteve esferas que se possam considerar perfeitamente esféricas, uma vez que os valores de esfericidade obtidos são todos superiores a 1.

A conclusão que se pode retirar dos resultados obtidos nesta etapa é que formulações distintas de soluções de alginato, por muito poucas diferenças que apresentem, irão originar esferas com características diferentes e deste modo cada formulação terá que ser otimizada individualmente para que as esferas posteriormente produzidas apresentem as características que se pretendem para a aplicação final das mesmas.

4.2. Desenvolvimento de novos produtos

Como já mencionado no ponto 3.1.2 deste trabalho, integrado no âmbito de um projeto de desenvolvimento interno da Frulact, o objetivo da segunda fase deste trabalho foi desenvolver esferas de alginato de queijo para aplicação final em produtos cárneos.

Tendo em conta este objetivo e sendo o queijo uma matéria-prima que na sua constituição natural possui cálcio, na primeira etapa utilizou-se o método de esferificação inversa e testaram-se formulações de seis queijos distintos (queijo fresco “Continente”, queijo fundido “A vaca que ri”, queijo creme “A vaca que ri”, queijo creme tipo flamengo “Continente” e queijo bola flamengo) com concentrações de cada queijo variáveis entre 5, 20 e 30 % (m/m) e procedeu-se ao processo de gelificação sobre soluções de alginato de sódio com concentrações de 0,35, 0,5, 0,75 e 1% (m/m). No entanto em nenhum dos casos testados se observou a formação de esferas, salientando-se ainda que no caso específico do queijo bola flamengo não se conseguiu sequer que este fundisse em água quente.

Tendo em consideração os resultados acima descritos analisaram-se os rótulos dos queijos creme e fundido “A vaca que ri” verificando-se que a quantidade de cálcio presente na sua constituição 250 mg/100 g e 260 mg/100 g, respetivamente seria provavelmente insuficiente para reagir com o alginato presente em solução e consequentemente o método de esferificação inversa não funcionar nestas condições.

Para tentar solucionar o facto de não se conseguir produzir esferas de queijo devido à situação acima exposta, ponderou-se experimentar duas hipóteses nomeadamente o método de gelificação por difusão “normal” ou aumentar o conteúdo de cálcio na formulação e, neste caso, utilizar o método de esferificação inversa. No entanto, uma vez que posteriormente seria mais fácil transpor a solução para nível produtivo e a Frulact possui o equipamento necessário à produção de esferas de alginato, selecionou-se a hipótese de efetuar as experiências utilizando o processo de esferificação normal.

Na segunda etapa utilizou-se o método de gelificação por difusão e testaram-se seis formulações iniciais de dois queijos distintos (queijo fundido “A vaca que ri” e o queijo creme tipo flamengo “Continente”) variando a concentração de queijo em dois níveis, 5 e 10 % (m/m), a concentração de alginato de sódio entre 0,5 e 1 % (m/m) e a concentração de sal entre 1 e 2 % (m/m). Iniciando este conjunto de experiências com a formulação contendo 5 % (m/m) queijo fundido, 1 % (m/m) sal e 0,5 % (m/m) de alginato resultou um preparado demasiado líquido, não sendo possível proceder à gelificação por difusão deste.

Assim, passou-se imediatamente para a preparação de formulações com 5 e 10 % (m/m) de queijo, respetivamente e 1 % (m/m) de alginato resultando ambas em soluções passíveis de se proceder ao processo de gelificação por difusão mas apenas com pipetas de Pasteur de plástico e não com os suportes existentes no laboratório da Frulact para este objetivo (recipiente com pontas plásticas ou com pontas metálicas).

Tendo em consideração os resultados acima descritos percebeu-se que era necessário aumentar a viscosidade do preparado para se poder utilizar o equipamento laboratorial e industrial para a produção de esferas de alginato existente na Frulact. Neste sentido, estabeleceram-se novas formulações tomando como base a que incorporava 10 % (m/m) queijo, 1 % (m/m) alginato e 2 % (m/m) sal, aumentando a concentração de queijo incorporada nomeadamente 30, 50, 70 e 90 % (m/m) ou incorporando 2 % (m/m) de amido nativo de milho.

Das formulações, com os dois tipos de queijos testados nesta etapa, em que foram incorporados 2 % (m/m) de amido nativo de milho conseguiu-se obter esferas de alginato com queijo utilizando o recipiente com pontas metálicas, mas as esferas ficavam à superfície da solução de cloreto de cálcio, implicando a necessidade de agitação desta solução durante o processo para que não se formem aglomerados em vez de esferas individualizadas.

Relativamente às formulações em que se incorporaram concentrações de queijo superiores a 30 % (m/m), tal como no caso descrito anteriormente, conseguiu-se obter esferas de alginato com queijo utilizando o recipiente com pontas plásticas e metálicas, mas as esferas também ficavam à superfície da solução de cloreto de cálcio, sendo necessário realizar a agitação desta solução. Ao elaborar a formulação incorporando 50 % (m/m) de queijo resultou um preparado muito espesso, o que tornou a operação muito lenta e levou à formação de “lágrimas” no lugar de esferas. Deste modo, nas formulações que se prepararam posteriormente com 70 e 90 % (m/m) de queijo fundido ajustou-se a concentração de alginato para 0,5 % (m/m). No entanto, em ambos os casos apesar de se ter conseguido formar esferas, estas após cerca de 30 minutos transformam-se numa “pasta”. É importante salientar que as esferas obtidas a partir das formulações onde se incorporou amido apresentavam um aspeto mais esférico, separavam-se mais facilmente umas das outras e apresentavam uma cor próxima do branco.

A partir deste momento, a descrição das experiências efetuadas e respectivos resultados referem-se apenas à aplicação do queijo creme tipo flamengo, uma vez que as esferas produzidas com este tipo de queijo apresentavam um sabor mais intenso e em reunião com o possível cliente deste produto foi decidido que as esferas de queijo deveriam ter o sabor típico do queijo flamengo.

Na terceira etapa do trabalho considerou-se como base uma formulação com 30 % (m/m) queijo, 1 % (m/m) alginato e sem amido adicionado, testaram-se diferentes amostras de aromas de queijo e, posteriormente, corantes, mas neste caso utilizando já as aromatizações escolhidas. O preparado foi dividido e aromatizado com as diferentes amostras de aromas dando-se posteriormente a provar a 16 colaboradores distintos da Frulact, para que estes escolhessem entre dois a três dos preparados que os fizessem lembrar o sabor do queijo presente numa tosta mista. Os resultados da preferência sensorial dos colaboradores da Frulact apresentam-se na Tabela 18.

Tabela 18. Análise sensorial do preparado com 30 % (m/m) queijo para a escolha do aroma a utilizar na produção de esferas de alginato.

Código	Descrição	Limites dosificação (%)	Valor médio dosificado (%)	Resultado an. sensorial
Ar_001	Q. Mozzarella	0,060 – 0,150	0,105	11
Ar_002	Q. Mozzarella	0,080 – 0,120	0,100	4
Ar_003	Q. Azul	0,050 – 0,150	0,100	2
Ar_004	Q. Curado (tipo italiano)	0,050 – 0,150	0,100	5
Ar_005	Queijo	0,080 – 0,150	0,115	7
Ar_005 (dil 1:10)	Queijo	--- ---	0,115	--- ---
Ar_006	Queijo	0,050 – 0,150	0,100	7
Ar_007	Fresco	0,050 – 0,150	0,100	3
Sem Aroma	Preparado – 30% (m/m) queijo	--- ---	--- ---	2

Uma vez que na Frulact não havia experiência anterior em trabalhar com aromas de queijo e tendo em consideração os limites de dosificação indicados nos rótulos de cada amostra de aroma, comparou-se o preparado aromatizado com o aroma Ar_005 e o com a sua diluição a 10 % e decidiu-se que em termos de sabor o preparado preferido era o aromatizado com o aroma sem diluição, pois apresentava um sabor mais intenso a queijo. Deste modo, os restantes aromas foram todos incorporados no preparado tendo em conta o valor médio do intervalo de limites de dosificação. Relativamente aos diferentes aromas os

colaboradores da Frulact envolvidos na análise sensorial preferiram, na sua maioria, as amostras Ar_001, Ar_005 e Ar_006.

Tendo em consideração os resultados anteriores e as “perdas” que existem na gelificação do preparado em esferas de alginato decidiu-se aumentar em 20% a dosificação do aroma a utilizar nas formulações para as esferas de alginato, relativamente à dosificação média expressa na Tabela 18.

Para a escolha do corante a utilizar na coloração das esferas de alginato, para que esta se aproximasse da cor do queijo flamengo, consultou-se a legislação^{30,31,32} referente aos produtos de queijo e desta percebeu-se que se poderiam usar como corantes, entre outros, os do grupo E160a – α , β e γ caroteno. No caso em estudo selecionaram-se para testar dois corantes já utilizados na Frulact, nomeadamente β – caroteno 1 % pó solúvel em água fria e um caroteno natural, constituído por uma mistura de α e β – carotenos. Prepararam-se soluções a 10 % de cada um dos corantes, testaram-se ambos os corantes no preparado e posteriormente produziram-se as esferas resultantes desses preparados já corados. As esferas produzidas a partir do preparado corado com β - caroteno ficaram com uma cor mais próxima do queijo flamengo comparativamente às produzidas a partir do preparado corado com a mistura de α e β – carotenos e com uma menor quantidade de corante adicionada, como tal o corante escolhido para prosseguir com as experiências foi o β – caroteno.

Posteriormente na quarta etapa do trabalho decidiu-se experimentar produzir esferas de alginato com aroma a queijo, que se pretendia que fossem duras, mas que efetivamente não contivessem queijo na formulação. As formulações testadas nesta etapa são apresentadas na Tabela 19.

No caso destas formulações estabeleceu-se uma quantidade de aroma superior à utilizada nos ensaios anteriores uma vez que não se tinha presente o queijo, que obviamente só por si transmite o seu sabor ao preparado e às esferas. No caso das formulações A e B utilizou-se em conjunto dois corantes, nomeadamente o β – caroteno e o dióxido de titânio para tentar obter esferas com uma cor idêntica à do queijo. No entanto, além do dióxido de titânio ser um aditivo cuja utilização não é permitida em queijo, os preparados resultantes destas formulações apresentavam grumos e eram demasiado espessos para se conseguir proceder à sua gelificação por difusão. Como consequência estabeleceu-se a formulação C que apenas contém como corante o β - caroteno, resultando

um preparado com características adequadas ao processo de gelificação por difusão e as esferas de alginato formadas resultantes eram amarelas translúcidas e duras.

Tabela 19. Formulações estabelecidas para a produção de esferas de alginato com sabor a queijo.

	A	B	C
	% (m/m)	% (m/m)	% (m/m)
Água	69,7	67,9	86,8
Sal	3,0	3,0	2,0
Amido	1,8	1,8	1,8
Alginato	1,5	1,0	1,5
Açúcar	15,0	25,0	7,5
Xarope	8,0		
Ar_001	0,2	0,7	0,2
β - caroteno	0,5	0,4	0,3
Diox. titânio	0,3	0,3	

Percebeu-se ainda da comparação da formulação C com as restantes formuladas sem queijo, que o dióxido de titânio poderia ser o causador da criação de grumos e como consequência do aumento da viscosidade que não permitiu que a operação de gelificação por difusão ocorresse da forma mais adequada.

Após as primeiras etapas do desenvolvimento das esferas de queijo decidiu-se testar a incorporação de três produtos com formulações distintas nomeadamente esferas sem queijo, esferas com 30 % (m/m) queijo e esferas com 50 % (m/m) queijo na aplicação inicialmente pretendida, especificamente em peças de fiambre de peru e perna extra. O objetivo de testar a incorporação destes produtos sem a sua otimização final consistiu em estudar a viabilidade da incorporação de esferas de alginato com diferentes texturas nas peças de fiambre e desta forma compreender em que sentido se deveria direccionar, nas próximas etapas, o desenvolvimento das esferas de queijo.

Pelo que se observou durante a realização destes testes preliminares percebeu-se que no caso do fiambre perna extra, ao cortar as peças de fiambre, as esferas sem queijo saltavam cerca de 10 a 20 %, as esferas com 50 % (m/m) de queijo saíam basicamente todas (aproximadamente 100%) e as com 30 % (m/m) queijo ficavam mais intactas que estas, mas mesmo assim saíam cerca 20 a 30%. No caso do fiambre de peru e, tendo este na sua constituição 2 – 4 % de fécula da batata (ou em alguns casos amido de milho), a sua consistência é distinta do fiambre perna extra o que permitiu que as esferas com 30 %

(m/m) de queijo se mantivessem praticamente intactas, embora as esferas com 50 % (m/m) de queijo voltassem a sair da fatia de fiambre em elevada percentagem, apesar de se perceber que a superfície da esfera ficava agarrada na fatia de fiambre. Destas observações concluiu-se que o desenvolvimento posterior devia caminhar no sentido do produto final apresentar uma integridade idêntica às esferas sem queijo, tendo que se estudar e trabalhar mais o parâmetro da firmeza das esferas e não tanto a ligação das mesmas à peça de fiambre.

Além disso, ao provar individualmente as esferas com 30 % (m/m) queijo e incorporadas nas peças de fiambre detetou-se um sabor azedo e deste modo concluiu-se que se tinha que estudar a melhor maneira para conservar as esferas durante o seu período de armazenamento, no mínimo 15 dias, mas ótimo se fossem 3 a 4 semanas, antes serem incorporadas nas peças de fiambre.

Assim decidiu-se que as próximas etapas do desenvolvimento das esferas de queijo seriam testar formulações contendo entre 0 a 30 % (m/m) queijo, formulações contendo diferentes concentrações de amido de milho, formulações com quantidades superiores de aroma devido às perdas de aromatização que ocorrem durante a produção dos fiambres e ainda pesquisar e testar a melhor forma de conservar o produto.

No início da quinta etapa do desenvolvimento das esferas de queijo estabeleceu-se uma formulação com 15 % (m/m) queijo, 1,5 % (m/m) amido modificado de milho considerado mais resistente à temperatura e 0,1 % (m/m) sorbato de potássio, para perceber se com a incorporação deste conservante o sabor azedo detetado anteriormente continuava a aparecer. As esferas produzidas foram provadas e posteriormente armazenadas em condições distintas nomeadamente à temperatura ambiente e à temperatura de refrigeração, com o intuito de serem provadas durante um período de tempo para se perceber se havia alterações sensoriais significativas.

Após 5 dias de armazenamento, nas condições acima mencionadas, realizou-se a gustação das esferas e as conclusões retiradas foram que as armazenadas à temperatura ambiente já apresentavam sabor azedo mas as que se encontravam armazenadas em condições refrigeradas não. Uma nota importante salientada pelos provadores é que no líquido libertado pelas esferas o sabor desagradável era mais intenso. Mantiveram-se as esferas armazenadas nas mesmas condições até perfazer 15 dias e repetiu-se a análise, sendo que ao fim deste período todas as amostras apresentavam cheiro e sabor

desagradável. Realizaram-se ainda análises microbiológicas segundo o procedimento mencionado no ponto 3.2.8 mas no meio PCA para detecção de mesófilos totais apareceu uma contaminação não sendo assim possível retirar resultados mas relativamente à análise de bolores e leveduras esta resultou positiva para a presença destes microrganismos.

Paralelamente a estas análises e com o objetivo de testar a quantidade máxima de amido que seria possível adicionar à formulação e deste modo conseguir testar esferas nas peças de fiambre com texturas diferentes, experimentaram-se quatro formulações incorporando 4, 3, 2,5 e 2 % (m/m) de amido modificado de milho, respetivamente. Apenas com as formulações contendo 2,5 e 2 % (m/m) de amido modificado de milho se conseguiram produzir esferas porque nas restantes situações os preparados resultantes eram muito viscosos/espessos que nem a temperaturas elevadas (80/90 °C) se conseguia proceder ao processo de gelificação por difusão. No entanto observou-se nestas experiências um fato muito importante nomeadamente que as esferas formadas não ficavam à superfície da solução de cloreto de cálcio, o que acontecia nas etapas anteriores deste desenvolvimento, o que permitiu que não fosse obrigatória a agitação desta solução, uma vez que desta forma já não se formavam aglomerados mas sim as esferas pretendidas.

Perante estes resultados decidiu-se testar novamente a incorporação de três produtos distintos nas peças de fiambre nomeadamente, produto 1_A (15 % (m/m) queijo, 1 % (m/m) alginato, 1,5 % (m/m) amido e a dose “normal” Ar_005), produto 1_B (15 % (m/m) queijo, 1 % (m/m) alginato, 1,5 % (m/m) amido e 1,4 vezes a dose “normal” Ar_005) e o produto 2_A (15 % (m/m) queijo, 1 % (m/m) alginato, 2,5 % (m/m) amido e dose “normal” Ar_001; esta versão também deveria ter sido preparada com Ar_005 no entanto este terminou ao preparar as restantes versões de esferas) com o objetivo de testar a dosificação do aroma bem como a viabilidade da incorporação das esferas de queijo com diferentes concentrações de amido nas peças de fiambre.

É importante salientar que as formulações dos testes preliminares foram definidas para a produção de 250/500 g de preparado, enquanto para o envio destas amostras foram definidas para a produção de 2500 g de preparado. Assim, na preparação destes produtos observou-se um facto que não foi possível identificar nos testes preliminares uma vez que a operação de gelificação por difusão nesses casos era rápida, nomeadamente que com o arrefecimento do preparado e ao longo da operação este adquiriu uma espessura/viscosidade bastante elevada que mesmo que se voltasse a aquecer o preparado

no micro-ondas não diminuía, chegando o preparado que se encontrava em repouso num recipiente a formar um “pudim”. Este fato poder-se-á dever à reação entre o alginato e o cálcio (presente em baixa concentração) existentes em simultâneo no preparado, ocorrendo assim o fenómeno de gelificação. Este fenómeno poderá ser possivelmente contornado a nível industrial uma vez que nessa situação é possível realizar um controlo mais eficaz da temperatura do preparado ao longo do tempo de operação e esta realiza-se de forma mais contínua e homogénea.

Voltando ao estudo da conservação das esferas de queijo, com o objetivo de lhes aumentar o tempo de vida, e uma vez que se pretendia que estas fossem incorporadas em produtos cárneos tinha que se ter em consideração a legislação respeitante a estas duas categorias de géneros alimentícios. Assim após a consulta da legislação³² para as categorias “01.7. Queijos e produtos à base de queijo” e para “08. Carne” verificou-se que os conservantes possíveis de usar sem muitos impedimentos, apenas no teor máximo admissível consoante o produto em específico, são os do grupo E200 – 203: Ácido sórbico – sorbatos. Para perceber um pouco mais da forma e condições de atuação deste grupo de conservantes consultou-se o livro “Conservacion Quimica de los Alimentos” de Dr. Eric Lück³³ do qual se retirou a informação que este grupo de conservantes têm uma boa atividade contra leveduras e bolores e baixa atividade contra bactérias, sendo a sua atividade predominante a pH ácido.

Tendo em consideração estas informações experimentou-se acidificar o preparado com ácido láctico mas este resultou muito espesso e ao proceder ao processo de gelificação por difusão deste não se formaram esferas mas sim uma “pasta”, podendo tal facto dever-se, entre outros fatores, a este ácido ter atividade quelante de iões cálcio (Ca^{2+}) e, consequentemente, estes iões não estarem disponíveis para reagir com o alginato. Assim sendo, para tentar eliminar todas as interferências que o ácido orgânico pudesse ter no preparado e na reação com o cloreto de cálcio experimentou-se posteriormente acidificar o preparado com um ácido inorgânico forte nomeadamente ácido clorídrico 1 mol/L, mas também neste caso o preparado “colha”/“coagula”, ficando com grumos e impedindo deste modo a realização do processo de gelificação por difusão. Destas experiências concluiu-se que o problema seria da diminuição do pH do preparado e não do tipo de ácido utilizado na acidificação.

Posteriormente decidiu-se experimentar incorporar numa “calda” acidificada (tal como a Frulact faz no caso das restantes referências de esferas já em produção) com ácido láctico, com o mesmo teor de sal e açúcar que a formulação do preparado, 50 % (m/m) de esferas de queijo para perceber se o crescimento microbiano diminuía ou se era mesmo eliminado de forma que as esferas não ganhassem o sabor azedo e desagradável que nas situações sem qualquer tipo de conservação. Com esse objetivo testaram-se formulações com 2 % (m/m) amido modificado milho e sem nenhum conservante incorporado, com 1,5 % (m/m) amido modificado milho com e sem recurso a um conservante, nomeadamente 0,1 % (m/m) de sorbato de potássio. As amostras de esferas de queijo relativas a cada formulação foram armazenadas à temperatura ambiente, à temperatura de refrigeração, à temperatura de congelação e na calda acidificada com ácido láctico também posteriormente armazenada à temperatura de refrigeração. Neste último caso testaram-se dois pH's da calda inicial distintos nomeadamente 3,0 e 2,0 uma vez que após se incorporar as esferas na calda o pH aumentava para valores mais elevados podendo não ser os adequados para a atividade ótima do sorbato de potássio. Os valores relativos ao pH da calda antes e após incorporação das esferas bem como após 24 h de armazenamento são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Valores de pH da calda e das esferas armazenadas nesta.

Formulação	pH calda (antes esferas)	pH calda (depois past. esferas)	pH calda (após 24h)	pH esferas (após 24h)
2 % (m/m) Amido modificado	3,12	--- ---	5,80	5,66
1,5 % (m/m) Amido modificado + sorbato potássio + Ar_005	3,06 2,13	5,06 3,31	5,47 2,98	5,47 3,02
1,5 % (m/m) Amido modificado + sem sorbato potássio + sem Ar_005	2,13	3,35	2,94	3,00
1,5 % (m/m) Amido modificado + sem sorbato potássio + com Ar_005	2,07	3,33	2,99	3,00

Pela análise da Tabela 20 percebeu-se que após adição das esferas o pH da calda aumenta e como tal o pH inicial desta deverá ter esse aspeto em consideração, até porque

desta forma consegue-se garantir que a calda e as esferas se manterão com valores de pH dentro do espectro de ação do sorbato de potássio nomeadamente $3 \leq \text{pH} \leq 4,3$ ³³ e assim encontrar-se-ão em condições menos favoráveis ao desenvolvimento microbiano.

Todas as amostras de esferas acima mencionadas foram sujeitas a uma avaliação microbiológica, apenas qualitativa, de mesófilos totais, bolores e leveduras, após uma semana de armazenamento nas condições definidas. Os resultados qualitativos desta análise microbiológica são apresentados na Tabela 21.

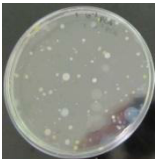

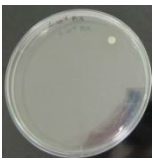

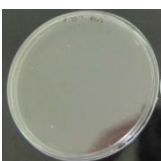






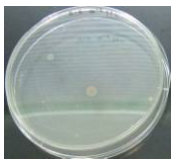
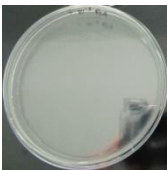
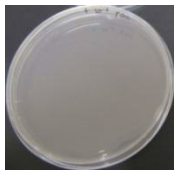
Pela análise da Tabela 21 verificou-se que as condições ambientais são as mais propícias ao desenvolvimento microbiano, seguidas das condições de armazenamento em refrigeração. Deste modo, a nível microbiológico, as soluções mais seguras para a conservação das esferas de queijo são a congelação ou a incorporação das esferas numa calda ácida, com pH inicial próximo de 2.



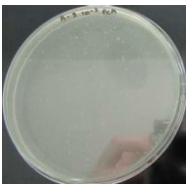




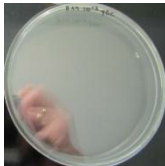

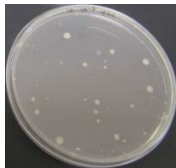

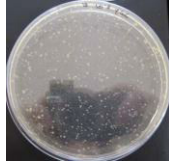
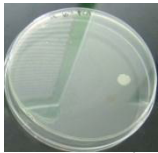

No entanto é importante salientar que as esferas congeladas após descongelação apresentavam muito líquido envolvente, diminuíram de tamanho e algumas encontravam-se mesmo deformadas não sendo assim uma solução plausível para o produto final. Relativamente às esferas armazenadas na calda ácida tiveram que ser lavadas em água corrente e abundante, para que não transmitissem o sabor ácido ao produto alimentar no qual estarão incorporadas. Posteriormente foram provadas por colaboradores da Frulact e, em geral, foi referenciado que estas esferas não apresentavam o sabor desagradável das amostras analisadas anteriormente mas também que a dosificação de aroma a queijo deveria ser aumentada consideravelmente nas formulações das esferas.

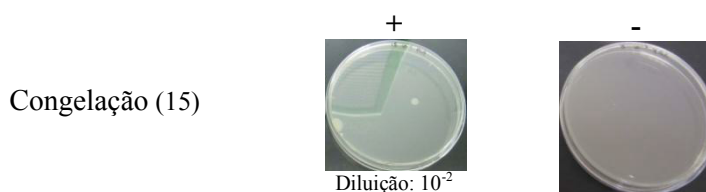
As amostras número 7 e 14 foram novamente analisadas microbiologicamente após três semanas da sua preparação para se tentar perceber se nesse período houve algum desenvolvimento microbiano, tendo em consideração que este seria o tempo que se definiu para as esferas estarem em *stock* antes serem incorporadas nas peças de fiambre. Os resultados qualitativos desta análise microbiológica são apresentados na Tabela 22.

Pela análise da Tabela 22 percebeu-se que incorporar as esferas numa calda ácida é uma solução para manter as esferas de queijo armazenadas durante 3 semanas sem que haja desenvolvimento microbiano e consequentemente sem aparecimento de odores e sabores desagradáveis associados ao produto final.

Tabela 21. Resultados qualitativos da análise microbiológica realizada às esferas, após uma semana de armazenamento.

Formulação	Condições armazenamento esferas	Mesófilos totais (PCA)	Bolores e leveduras (YGC)
2 % (m/m) Amido modificado	T. refrigeração (1)	++ 	++ 
	Calda (2) (T. refrigeração)	+ 	+++ 
	Após calda 24h (3)	- 	- 
1,5 % (m/m) Amido modificado + sorbato potássio + Ar_005	T. refrigeração (4)	+++ 	++++ 
	T. ambiente (5)	++++ 	++++ 
	Calda pH inicial = 3,06 (T. refrigeração) (6)	+ 	+ 
			Diluição: 10 ⁻²
	Calda pH inicial = 2,13 (T. refrigeração) (7)	- 	- 


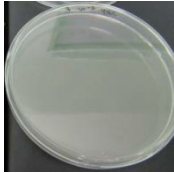

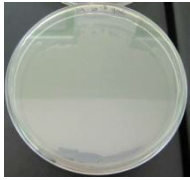
Formulação	Condições armazenamento esferas	Mesófilos totais (PCA)	Bolores e leveduras (YGC)
1,5 % (m/m) Amido modificado + sem sorbato potássio + sem Ar_005	T. refrigeração (8)	+++ 	+++ 
	T. ambiente (9)	+++++ 	+++++ 
	Calda pH inicial = 2,13 (T. refrigeração) (10)	- 	- 
	Congelação (11)	+ 	- 
1,5 % (m/m) Amido modificado + sem sorbato potássio + com Ar_005	T. refrigeração (12)	++ 	+++ 
	T. ambiente (13)	++++ 	++++ 
	Calda pH inicial = 2,07 (T. refrigeração) (14)	+  Diluição: 10 ⁻²	- 



Legenda: -) Não contaminado; +) Pouco contaminado; ++ Contaminado; +++ Muito contaminado; ++++) Bastante contaminado; +++++) Extremamente contaminado.

Nota: Em geral, todas as fotografias são referentes à diluição 10⁻³. Caso seja referente a outra diluição é referenciado junto à respectiva fotografia (significa que na diluição 10⁻³ não foram identificados microrganismos).

Tabela 22. Resultados qualitativos da análise microbiológica realizada às esferas, após três semanas de armazenamento.

Formulação	Cond. armazenamento esferas	Mesófilos totais (PCA)	Bolores e leveduras (YGC)
1,5 % (m/m) Amido modificado + sorbato potássio + Ar_005	Calda pH inicial = 2,13 (T. refrigeração) (7)	-	-
			
1,5 % (m/m) Amido modificado + sem sorbato potássio + Ar_005	Calda pH inicial = 2,07 (T. refrigeração) (14)	-	-
			

Legenda: -) Não contaminado; +) Pouco contaminado; ++ Contaminado; +++ Muito contaminado; ++++) Bastante contaminado; +++++) Extremamente contaminado.

Ao longo do desenvolvimento do produto foram ainda realizados dois ensaios adicionais para tentar solucionar o problema das esferas produzidas ficarem à superfície da solução de cloreto de cálcio e deste modo a agitação desta solução ser obrigatória para que não se formassem aglomerados.

O primeiro ensaio e pensando-se que o problema acima mencionado seria originado pelo teor em gordura do queijo, estabeleceu-se uma formulação com 30 % (m/m) queijo “Vaca que ri light”, com um teor de gordura 50% inferior ao queijo da mesma marca normal, e 1 % (m/m) alginato. No entanto a situação das esferas ficarem à superfície da solução de cloreto de cálcio manteve-se e consequentemente a necessidade de agitação desta solução também. No segundo ensaio elaborou-se uma formulação com 30 % (m/m)

queijo creme tipo flamengo “Continente”, 1 % (m/m) de alginato e o emulsificante E471 – Mono e diglicerídeos de ácidos gordos. Primeiro preparou-se a emulsão e só depois esta foi adicionada ao preparado como uma matéria-prima normal e só depois se adicionou o alginato, como na preparação normal de um preparado. Ao proceder à gelificação por difusão do preparado na solução de cloreto de cálcio as esferas não ficaram à superfície, tornando o uso de um emulsificante uma via alternativa ao uso do amido modificado de milho.

Uma vez que não se obtiveram, em tempo útil, por parte do possível cliente deste produto os resultados da incorporação das esferas de alginato formuladas com diferentes concentrações de amido e/ou aroma e entretanto o estágio curricular na Frulact, S.A. terminou não se realizaram ensaios posteriores, no entanto como sugestões de novos ensaios sugere-se que se testem concentrações superiores de aroma e mesmo outros aromas que aproximem o sabor das esferas mais ao do queijo flamengo, queijo (s) passíveis de serem fornecido (s) a nível industrial, uma vez que os utilizados neste desenvolvimento além de serem difíceis de obter em quantidades elevadas, iriam encarecer substancialmente o produto final uma vez que os seus preços no mercado destinado ao consumidor final são nomeadamente, queijo fundido para barrar “A vaca que ri” – 9,98 €/kg e queijo creme flamengo continente – 13,52 €/kg, a possibilidade de produzir esferas de maiores dimensões (pedido do possível cliente) e posteriormente se realize um teste industrial para perceber se se conseguirá transpor o processo de produção das esferas de queijo, em específico, da escala laboratorial para a industrial.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os alginatos são dos polissacarídeos mais usados na indústria alimentar, devido às suas propriedades gelificantes e estabilizantes e capacidade para alterar a viscosidade dos sistemas onde sejam incorporados. Têm ainda elevada popularidade devido a ser um dos compostos mais utilizados para encapsulamento, e as suas esferas gelificadas por serem frequentemente usadas como matriz de aprisionamento e libertação controlada de moléculas com importância biológica.

A produção de esferas de géis de alginato e as muitas variáveis associadas ao processo têm que ser analisadas experimentalmente, para se perceber quais as condições que levam à formação de esferas com as características adequadas à aplicação pretendida.

Tendo tal fato em consideração e os resultados acima apresentados concluiu-se que concentrações elevadas de alginato originam esferas com massa e firmeza superiores e adesividade inferior do que concentrações mais baixas deste composto. Relativamente à concentração de cloreto de cálcio concluiu-se que, concentrações mais elevadas dão origem a esferas mais firmes mas concentrações baixas de cloreto de cálcio dão origem a esferas com massa superior e adesividade inferior. Quanto se analisou o efeito da temperatura do preparado concluiu-se que esta tinha principalmente efeito na eficiência, na produtividade e no tempo de operação do que propriamente nas características das esferas. Sem informação acerca do conteúdo/proporção em monómeros de ácido manurónico e gulurónico testaram-se alginatos distintos, mas o que se concluiu destas análises foi que caso venha a ser necessária e/ou útil a sua posterior utilização, então nessa altura deverá ser realizado um processo de otimização das condições de atuação do alginato em causa. No que se refere às condições do tratamento térmico, nomeadamente temperatura e tempo de pasteurização, concluiu-se que a temperatura de pasteurização tinha um efeito estatisticamente significativo na maioria das características das esferas excetuando na resiliência e esfericidade enquanto quando se estuda como fator fixo o tempo de pasteurização apenas se verificam diferenças significativas no caso da massa, adesividade, gomosidade, mastigabilidade e resiliência das esferas. Deste modo percebeu-se que apesar das condições de pasteurização terem efeito nas características das esferas não se consegue estabelecer um modelo que as relacione.

Numa perspetiva futura, no âmbito desta fase do trabalho, seria interessante estudar com mais pormenor as diversas variáveis associadas ao processo de gelificação por difusão

(Figura 10) a aplicação de diferentes corantes e aromas bem como o comportamento de migração de solutos entre a matriz e o solvente.

A inovação, investigação e desenvolvimento é uma necessidade permanente na indústria alimentar. Deste modo na segunda fase deste trabalho, tendo em consideração o conhecimento anteriormente adquirido desenvolveu-se um novo conceito de esferas de alginato nomeadamente esferas de queijo para aplicação em produtos cárneos.

Demonstrou-se que se podem produzir esferas viáveis até uma incorporação de 50 % (m/m) de queijo, mas o produto final desenvolvido apresenta na sua constituição 15 % (m/m) queijo e para garantir a sua segurança a nível microbiológico deve ser incorporado numa calda ácida, posteriormente armazenada em condições de refrigeração, pelo período de tempo que antecede a sua aplicação no produto final.

Numa perspetiva futura, no âmbito desta fase do trabalho, seria interessante estudar a aplicação de queijo (s) possível de ser fornecido (s) a nível industrial, a possibilidade de produzir esferas com dimensão maior e realizar um teste industrial para se compreender se se consegue transpor o processo de produção das esferas de queijo da escala laboratorial para a industrial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferreira, M. P., Santos, J. C., Serra, F. R., *Ser Empreendedor - Pensar, Criar e Moldar a Nova Empresa*. 1ª ed.; Edições Sílabo: Lisboa, 2008.
2. Frulact, S. A. "Frulact - Selecção Natural". <http://www.frulact.pt/> (acedido Set. 2011).
3. Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P., *Food Chemistry*. 4th revised and extended ed.; Springer - Verlag: Berlim Heidelberg, 2009.
4. Walter, R. H., *Polysaccharide association structures in food*. Marcel Dekker, Inc.: Geneva, New York, 1998.
5. Almdal, K.; Dyre, J.; Hvidt, S.; Kramer, O., Towards a phenomenological definition of the term 'gel'. *Polymer Gels and Networks* 1993, 1 (1), 5-17.
6. Blanshard, J. M. V., Mitchell, J.R., *Polysaccharides in Food*. Butterworths: London - Boston, 1979.
7. Gil, A. M. P. C., *Gelificação de Polissacarídeos: Métodos Físico-Químicos no estudo da influência de iões*. Departamento Química: Universidade Aveiro, 1990.
8. Costa, M. A. F. B., *Produção microbiana de alginatos*. Departamento de Zoologia: Universidade de Coimbra, 1992.
9. Ministério da Agricultura, D. r., Pescas, Decreto - Lei nº 121/98. Diário da República - I - Série A: 1998; Vol. 106, pp 2142-2153.
10. Williams, P. A., Phillipis, G. O., *Gums and Stabilisers for the Food Industry 11*. Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2002.
11. Stephen, A. M., Phillips, G.O., Williams, P.A., *Food Polysaccharides and their applications*, 2ªed. Taylor & Francis Group, LLC: United States of America, 2006.
12. Rinaudo, M., 2.21 - *Seaweed Polysaccharides*. Elsevier: Oxford, 2007; p 691-735.
13. Cargill, I. "Ingredientes e sistemas para a indústria de alimentos e bebidas". www.cargill.com/food/lat/pt (acedido Jun. 2012).
14. Harris, P., *Food gels*. Elsevier Science Publishers, LTD: England, 1990.
15. FMC, C. "FMC BioPolymer - Food Ingredients". <http://www.fmcbiopolymer.com/> (acedido Nov. 2011).
16. Imeson, A., *Thickening and Gelling Agents for food*. 2ª ed.; Chapman & Hall: New York, 1997.

17. McHugh, D. J., *Production, properties and uses of alginates*. Campbell, Australia, 1987
18. Rosenthal, A. J., *Food texture: measurement and perception*. Aspen Publishers, Inc: Gaithersburg, Maryland, 1999.
19. Glicksman, M., *Utilization of Natural Polysaccharide Gums in the Food Industry*. Academic Press: 1963; Vol. Volume 11, p 109-200.
20. Chan, E.-S.; Lee, B.-B.; Ravindra, P.; Poncelet, D., Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science* 2009, 338 (1), 63-72.
21. Chan, E.-S.; Lim, T.-K.; Voo, W.-P.; Pogaku, R.; Tey, B. T.; Zhang, Z., Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness. *Particuology* 2011, 9 (3), 228-234.
22. Lee, K. Y.; Mooney, D. J., Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 2012, 37 (1), 106-126.
23. Hassan, H. F.; Ramaswamy, H. S., Measurement and targeting of thermophysical properties of carrot and meat based alginate particles for thermal processing applications. *Journal of Food Engineering* 2011, 107 (1), 117-126.
24. Juck, G.; Neetoo, H.; Chen, H., Application of an active alginate coating to control the growth of *Listeria monocytogenes* on poached and deli turkey products. *International Journal of Food Microbiology* 2010, 142 (3), 302-308.
25. ISO 11036:1994 (E) – Sensory analysis – Methodology – Texture profile. 1ª ed.; Standardization, I. O., Ed. 1994.
26. Texture Technologies Corp and by Stable Micro Systems, L. "Texture Technologies". <http://www.texturetechnologies.com/> (acedido Dez. 2011).
27. Almeida, A., *Disciplina Segurança e Qualidade Alimentar - "Origem e Acção dos Microrganismos nos Alimentos"*. Universidade Aveiro: 2011.
28. ISO 4833:2003(E) - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30°C. 3ª ed.; Standardization, I. O., Ed. 2003.
29. Grilo, A., *Curso Análises Microbiológicas de Alimentos e Produtos Alimentares - "Microbiologia de Alimentos e Produtos Alimentares"*. Unidade Microbiologia Biocant: 2012.

30. Ministério do Planeamento, A. T., Agricultura, Pescas, Alimentação, Comércio, Turismo, Portaria nº 73/90. Diário da República - I - Série A: 1990; Vol. 27, pp 436-438.
31. Ministério do Planeamento, A. T., Agricultura, Pescas, Alimentação, Comércio, Turismo, Portaria nº 74/90. Diário da República - I - Série A: 1990; Vol. 27, pp 438-440.
32. Europeia, C., Regulamento (UE) Nº 1129/2011. Jornal Oficial União Europeia: 2011.
33. Luck, E., *Conservacion Química de los Alimentos*. Editorial Acribia: 1981.

7.2. Exemplos de aplicações de polissacarídeos em alimentos (adaptada de Belitz, 2009)³

Área de aplicação/Alimento	Polissacarídeos adequados
Estabilização de emulsões/suspensões em leite condensado e leite com chocolate	Carragenana, alginato, pectina, carboximetilcelulose
Estabilização de emulsões em branqueadores de café, margarinas com baixo teor em gordura	Carragenana
Estabilização dos gelados contra a formação de cristais, derretimento, separação de fases; melhoria da consistência (suavidade)	Alginato, carragenana, agar, goma arábica, goma xantana, farinha de alfarroba, amidos modificados, carboximetilcelulose, metilcelulose
Ligação de água, melhoria da consistência, aumentar rendimento de queijo mole, queijo cremoso, preparações queijo	Carragenana, agar, farinha de alfarroba, alginato, carboximetilcelulose
Espessamento e gelificação do leite em pudins feitos com e sem aquecimento, melhoria da consistência de cremes	Pectina, alginato, carragenana, farinha de alfarroba, carboximetilcelulose, amidos modificados
Ligação água, estabilização de emulsões em produtos cárneos (carne enlatada, salsichas)	Agar, farinha de alfarroba
Gelatinas para carnes, peixe e produtos vegetais	Alginato, carragenana, agar
Estabilização e espessamento, prevenção de sinérese, estabilidade no congelamento/descongelamento de sopas, molhos, molho para saladas, maionese, ketchup; obtenção de “corpo” em produtos com baixo teor de gordura e amido.	Alginato, goma xantana, farinha de alfarroba, carboximetilcelulose, propileno glicol alginato, amidos modificados
Estabilização da proteína da espuma na cerveja, chantilly, suspiros.	Alginato, carragenana, agar, goma arábica, goma xantana
Prevenção da retrogradação do amido em pães e bolos, ligação de água em massas de pão	Agar, farinha de alfarroba, carragenana, goma xantana
Espessamento e gelificação de polpas de fruta (geleias, gelatinas, polpa fruta para gelados e iogurtes)	Pectina, alginato
Gelificação de doces de geleia, gomas.	Pectina, alginato, carragenana, agar, goma arábica, amidos modificados
Estabilização de sedimentos em sumos fruta, obtenção de “corpo” de bebidas em pó	Alginato, pectina, propileno glicol alginato, goma arábica, goma xantana, metilcelulose.
Estabilização de emulsões de aroma em pó, encapsulamento de substâncias de aroma	Goma arábica, goma xantana

7.3. Hidrocolóides: Funções e aplicações alimentares (adaptada de Stephen, 2006¹¹)

Hidrocolóide	Função	Aplicação
Guar e farinha de alfarroba	Estabilizante, retenção água	Produtos lácteos, gelados, sobremesas, panificação
Carragenanas	Estabilizante, espessante, gelificante	Gelados, produtos cárneos, molhos, pudins instantâneos
Agar	Gelificação	Produtos lácteos, confeitaria, produtos cárneos
Goma arábica	Estabilizante, espessante, emulsionante, agente encapsulamento	Confeitaria, panificação, bebidas, molhos
Pectinas	Gelificação, espessante, estabilizante	Geleias, compotas, bebidas, confeitaria, produtos lácteos
Alginatos	Estabilizante, gelificante	Gelados, pudins instantâneos, bebidas
Goma xantana	Estabilizante, espessante	Molhos, bebidas, produtos lácteos, panificação
Carboximetilcelulose	Estabilizante, espessante, retenção de água	Gelados, massas, xaropes, misturas para bolos, carnes
Metilcelulose	Gelificação, estabilizante, retenção água	Redutor de gordura, panificação
Amidos modificados	Estabilizante, emulsionante	Panificação, sopas, confeitaria

7.4. Parâmetros de composição e sequência de alginatos derivados de algas¹¹.

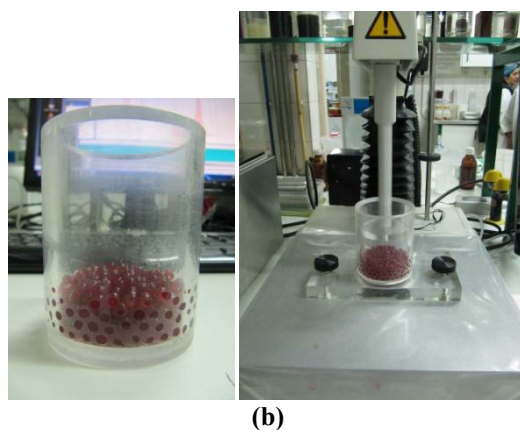
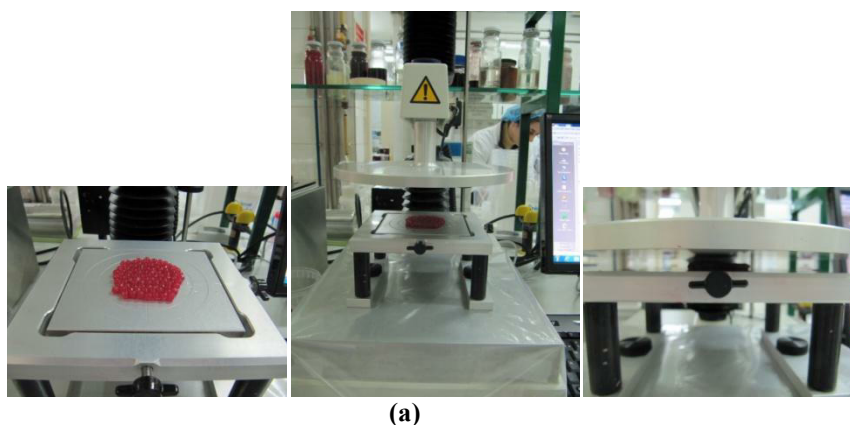
Source	F_G	F_M	F_{GG}	F_{MM}	$F_{GM, MG}$
<i>Laminaria longicruris</i> ^a	0.33	0.67	0.23	0.57	0.10
<i>L. japonica</i>	0.35	0.65	0.18	0.48	0.17
<i>L. digitata</i>	0.41	0.59	0.25	0.43	0.16
<i>L. saccharina</i> ^b					
New blade	0.35	0.65	0.25	0.55	0.10
Old blade	0.46	0.54	0.32	0.40	0.14
<i>L. brasiliensis</i>					
Blade	0.53	0.47	0.33	0.27	0.20
Stipe	0.54	0.46	0.31	0.23	0.23
<i>L. hyperborea</i>					
Blade	0.55	0.45	0.38	0.28	0.17
Stipe	0.68	0.32	0.56	0.20	0.12
Outer cortex	0.75	0.25	0.66	0.16	0.09
<i>Saccorhiza polyschides</i> ^b					
Blade	0.58	0.42	0.46	0.30	0.12
Stipe	0.49	0.51	0.34	0.36	0.15
<i>Lessonia nigrescens</i> ^a	0.38	0.62	0.19	0.43	0.19
<i>Ecklonia maxima</i>	0.45	0.55	0.22	0.32	0.32
<i>Macrocystis pyrifera</i>	0.39	0.61	0.16	0.38	0.23
<i>Egregia laevigata</i> ^a	0.43	0.57	0.26	0.40	0.17
<i>Eisenia bicyclis</i> ^a	0.38	0.62	0.25	0.49	0.13
<i>Durvillea antarctica</i>	0.29	0.71	0.15	0.57	0.14
<i>Ascophyllum nodosum</i>					
Fruiting body	0.10	0.90	0.04	0.84	0.06
Old tissue	0.36	0.64	0.16	0.44	0.20
<i>Hormosira banksii</i> ^b	0.39	0.61	0.35	0.57	0.04
<i>Himanthalia elongata</i>	0.39	0.61	0.21	0.43	0.18
<i>Dictyosiphon foeniculaceus</i>	0.67	0.33	0.61	0.27	0.06
<i>Elachista fucicola</i>	0.78	0.22	0.68	0.12	0.10
<i>Scytosiphon lomentaria</i> ^a	0.50	0.50	0.41	0.41	0.09

^aData provided by Bjørn Larsen.
^bData provided by Mentz Indergaard.
Source: From Oates, C.G., and Ledward, D.A., *Food Hydrocoll.*, 4(3), 215, 1990.

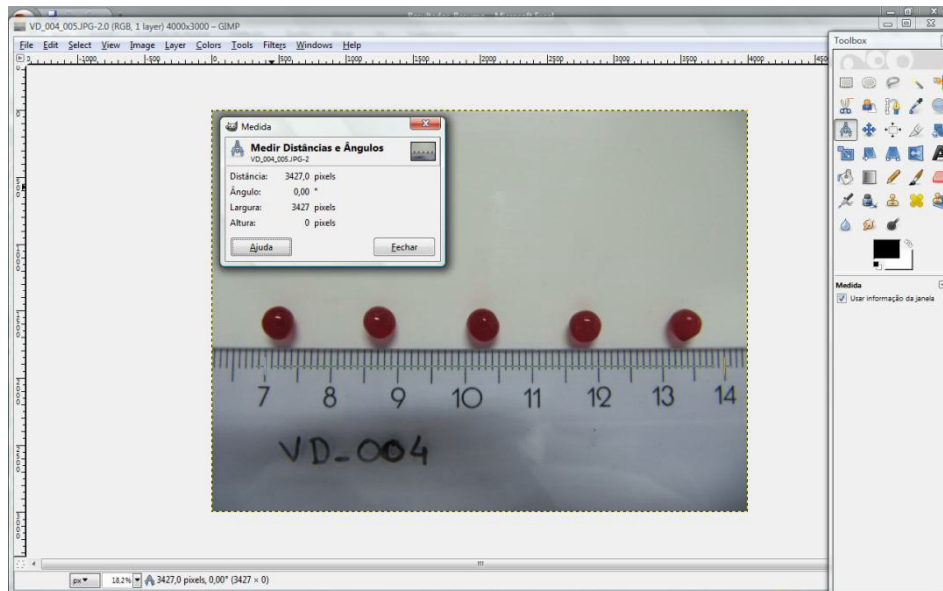
7.5. Características genéricas dos alginatos testados na terceira etapa do trabalho

Código	Viscosidade (sol. 1%)	pH (sol. 1%)	Perda por secagem (%)	Tamanho partículas
Alg_001	110 – 270 mPa.s (cP)	5.0 – 7.5	< 13	98%: > 355 µm 80%: > 250 µm
Alg_002	30 – 60 cP	6.0 – 8.5	< 15	90%: < 200 µm 99%: < 500 µm
Am_001	100 – 200 mPa.s (cP)	6.0 – 8.0	< 15	99%: > 125 µm
Am_002	40 – 90 mPa.s (cP)	5.0 – 7.5	< 15	98%: > 355 µm 80%: > 250 µm
Am_003	150 – 300 mPa.s (cP)	5.0 – 7.5	< 15	90%: > 355 µm 80%: > 250 µm
Am_004	360 mPa.s (cP)	7.4	14.5	< 3.0 % - > 200 µm

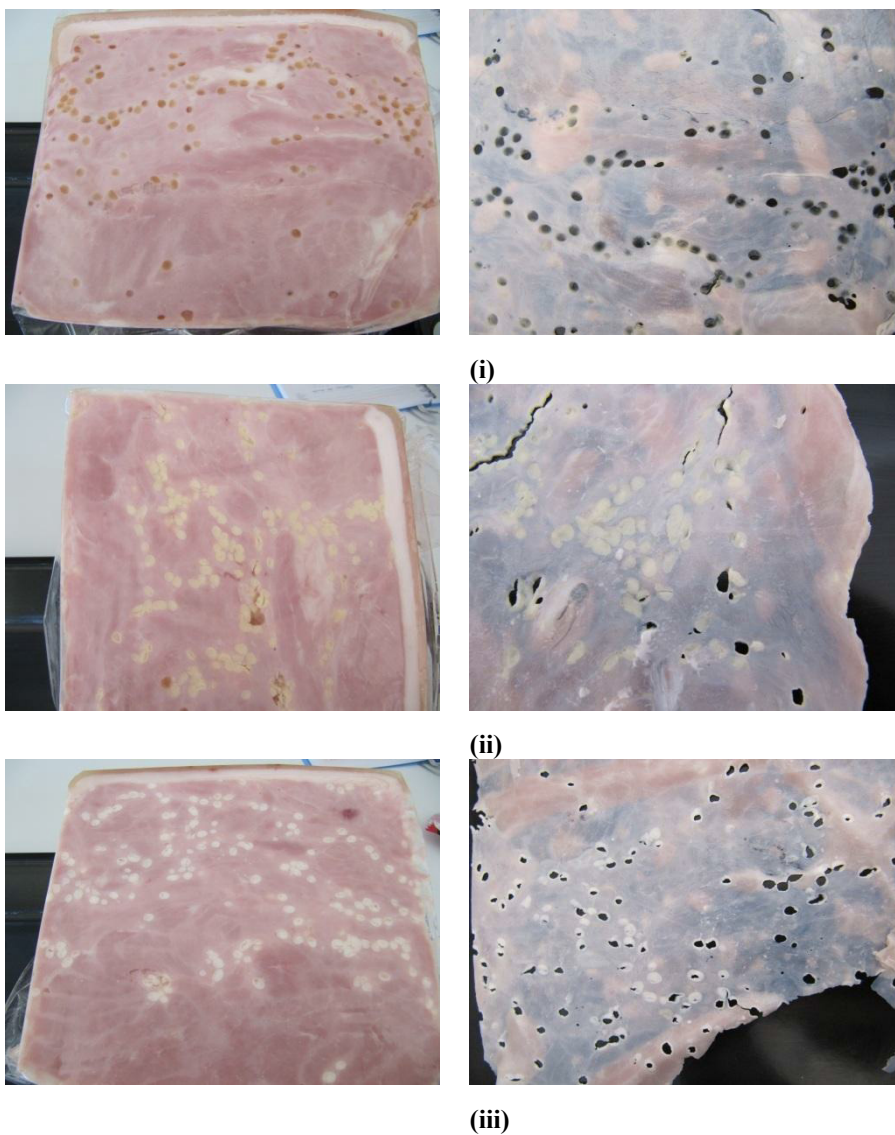
7.6. Fotografias da análise da textura das esferas de alginato utilizando como sonda a placa de compressão (a) e a sonda *Back Extrusion* (b)



7.7. Tratamento de imagem e determinação da relação entre pixéis e milímetros para a determinação da dimensão das esferas



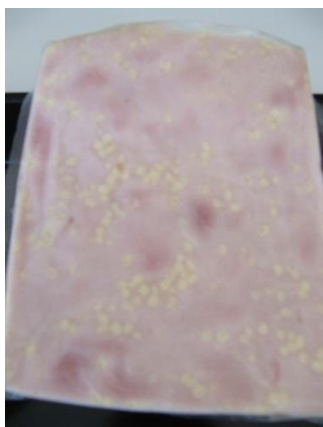
7.8. Fotografias dos testes preliminares de incorporação de esferas sem queijo (i), esferas com 30% queijo (ii) e esferas com 50% queijo (iii) em peças de fiambre perna extra



7.9. Fotografias dos testes preliminares de incorporação de esferas sem queijo (i), esferas com 30% queijo (ii) e esferas com 50% queijo (iii) em peças de fiambre de peru



(i)



(ii)



(iii)